

Rafael Mata de Medeiros

Licenciatura em Engenharia de Materiais



**Produção, caracterização e estudo de migração de
células na matriz dérmica do substituto de pele
Skin2**

Julho 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Rafael Mata de Medeiros

Licenciatura em Engenharia de Materiais

**Produção, caracterização e estudo de migração de
células na matriz dérmica do substituto de pele**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia de Materiais

Orientador: Professor Doutor Jorge Carvalho Silva, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Doutora Tânia Vieira, Investigadora Auxiliar, Faculdade Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Julho 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Produção, caracterização e estudo de migração de células na matriz dérmica do substituto de pele Skin2

Copyright © Rafael Mata de Medeiros, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Ao meu avô Quim,
por me fazer apreciar as coisas mais simples da vida!*

Agradecimentos

Depois destes anos de aprendizagem e crescimento como pessoa, chega a hora de agradecer a todos aqueles que me acompanharam e deixaram marca, de uma forma ou de outra, na minha vida académica.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Jorge Carvalho Silva. Pela sua paciência e dedicação, pela motivação dada e como não poderia deixar de ser, pelas repreensões feitas ao longo deste enorme trabalho de investigação pelo qual estou bastante grato em ter participado.

Em segundo lugar, à coorientadora Tânia Vieira pela perseverança prestada e pelo apoio constante dado para que tudo seguisse o rumo correto. Pela sua extraordinária e clarividente forma de agir e ajudar mesmo em alturas mais complicadas e confusas. Agradeço genuinamente.

Gostaria de prestar um agradecimento a todos os docentes que me deram aulas, de salientar o Professor João Paulo Borges que sempre pugnou pelos direitos dos alunos, tendo sido um professor excecional na sua atividade e trabalho.

Agradecer à minha família, Nelson Medeiros (pai), Paula Medeiros (mãe), Rodrigo Medeiros (irmão) e Rita Medeiros (irmã) pelo apoio incondicional que me deram. Pela compreensão e aceitação das minhas mudanças de humor drásticas de que foram alvo em vários momentos mais tensos e stressantes. Por aquilo que são para mim e por tudo o que encarna e vivemos no núcleo e seio familiar com sentimento de união muito forte e chegado. Depois gostava de agradecer à minha namorada Ana Catarina Neto por me apoiar e ajudar sempre que precisei. Sempre presente. Faltam-me as palavras suficientes para agradecer o que tem feito por mim. O quão importante é esta pessoa para mim!

Os amigos são a família que nós escolhemos, Diogo Ramos companheiro de várias aventuras no meu percurso académico. Um grande Obrigado por todos os conselhos que me deste e por todos os cafés que tive o prazer de beber contigo. És um amigo daqueles que poucas pessoas têm o prazer de ter. Ao meu irmão de praxe e faculdade, André Barreiro que é uma das melhores pessoas que já tive a oportunidade de conhecer. Adoro-te do fundo do coração. Ao Zé Vilhena por ser um amigo extraordinário que fiz nesta última fase de vida académica. Pela forma única que me fazes ver, de forma diferente e com perspetivas incomuns as coisas simples da vida, a sociedade e todos os problemas que ela envolve. Essencial para a minha estabilidade emocional em momentos críticos. Agradecer ao David Correia por ser um amigo enorme. Nunca pensei conhecer uma pessoa tão simples e compreensível.

Quero dar o meu agradecimento especial ao Gonçalo Pulquério e ao David Cidade por serem os meus amigos de sempre e por serem os meus braços direitos na vida. Sinto-me a pessoa mais grata deste mundo por vos ter na minha vida como amigos. Foram vocês que estiveram presentes e me ajudaram num momento difícil e deprimente da minha vida. Puxaram por mim e reergueram-me. Se há pessoas a quem devo agradecer pela minha boa disposição quase sempre quotidiana, é a vocês! Ao João Patrício e ao António Calretas pelos bons momentos passados, pelas saídas, pelos cafés na praia do Meco e pela boa disposição inevitável que se gera quando estamos juntos. Meu Amigão e minha Peninha, Obrigado!

Agradecer também ao Francisco Duarte, ao Pedro Sousa (meu Pequenino), à Mariana Castanheira, ao André Milho, ao Jorge Lourenço que sempre me ajudaram tanto e me impediram de entrar no desespero. Fizeram-me rir quando tinha vontade de chorar. À Catarina Roque, por ser uma das miúdas mais queridas e boa menina que eu já conheci.

Quero agradecer também a todos os meus 13 afilhados académicos por terem sido tão bons para o padrinho, destacando a Adriana Gonçalves e o Cezar Tipa que foram os que com mais tempo passei. O João Moura, grande companheiro tanto na CoPe de Materiais como nas pausas entre aulas. À Ritinha e à Joana Rosa por me aturarem tanto e terem tanta paciência para mim!

Gostava de agradecer a todos aqueles que estiveram presentes na minha vida, o pessoal do meu ano, como o João Duarte, Rafael Gameiro, Diogo Gomes, Filipa Gonçalves, Jorge Lourenço... Que me ouviram a desabafar, a contar piadas, a fazer palhaçadas, etc. Viram-me revoltado e triste, e conseguiram recuperar e reaver o verdadeiro Medeiros.

Obrigado a todos!

Resumo

A engenharia de tecidos combina células, biomoléculas e biomateriais para projetar estruturas para substituir ou regenerar tecidos ou órgãos danificados. Embora diversos substitutos da pele já estejam disponíveis no mercado, nenhum deles promove uma regeneração completa de lesões cutâneas graves. A matriz extracelular é a estrutura que suporta a adesão, diferenciação e proliferação celular. O objetivo deste estudo é produzir um *scaffold* tridimensional com características idênticas às da matriz extracelular que promova a regeneração dos tecidos.

De forma a obter-se *scaffolds* com as características desejadas, utilizou-se o processo de liofilização para produzir amostras de quitosano (CS), gelatina (GEL), policaprolactona (PCL) e de polioxietileno (PEO) em diferentes concentrações. Submeteram-se as amostras a diferentes tempos de reticulação através de desidratação térmica a 120 °C e posteriormente realizaram-se diversas caracterizações nomeadamente, perda de massa, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varrimento e culturas celulares de forma a analisar as suas propriedades bem como a influência do tempo de reticulação.

Os resultados dos estudos de liofilizados permitiram concluir que tempos de reticulação entre 24h e 72h permitem obter uma estrutura final mais satisfatória sendo mecanicamente forte preservando as propriedades dos polímeros utilizados. Quanto às concentrações testadas, as amostras de 0,6% de cada polímero em solução são as que apresentam um tamanho de poro adequado à adesão, proliferação e migração celular.

O processo de eletrofiação foi utilizado para produzir fibras de PEO. O objetivo era obtenção de fibras suficientemente grandes que permitam, numa fase final de obtenção do *scaffold*, originar canais essenciais à migração de células. Utilizaram-se diferentes pesos moleculares de PEO: 100 kDa, 400 kDa, 900 kDa, 2 MDa e 8 MDa. No entanto não foi possível obter fibras com um diâmetro regular e na gama das dezenas de micrómetros em qualquer uma das condições de produção testadas.

O desenvolvimento de um novo substituto de pele que promova a regeneração será uma solução viável ao qual todas as pessoas terão acesso, num futuro próximo.

Palavras-chave: quitosano; gelatina; polioxietileno; policaprolactona; FTIR; SEM; culturas celulares; eletrofiação; liofilização.

Abstract

Tissue engineering combines cells, biomolecules and biomaterials to design structures to replace or regenerate damaged tissues or organs. Although different skin substitutes are already available on the market, none of them promote a full regeneration of serious skin injuries. The extracellular matrix is the structure that supports cell adhesion, differentiation and proliferation. The aim of this study is to produce a three-dimensional scaffold with characteristics similar to those of the extracellular matrix that promotes tissue regeneration.

In this work, solution of chitosan (CS), gelatin (GEL), polycaprolactone (PCL) and polyethylene oxide (PEO) were produced at different concentrations using the freeze-drying process. CS and GEL samples were submitted to different crosslinking times through thermal dehydration (DHT) at 120 °C and subsequently characterized through mass loss, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and cell adhesion and proliferation in order to study their characteristics and the influence of the different crosslinking times.

The results of the lyophilized studies allowed us to conclude that crosslinking times between 24h and 72h allow to obtain an adequate mechanically strong final structure preserving the properties of the polymers used. As for the concentrations tested, the samples of 0.6% are those that have a pore size suitable for cell adhesion, proliferation and migration.

The electrospinning process was also used to produce PEO fibers with larger diameters in order to be used as sacrificial agent to create large pores in matrices composed by PCL, GEL and CS. PEO with different molar masses (100 kDa, 400 kDa, 900 kDa, 2 MDa e 8 MDa) were used. However, it was not possible to obtain fibers with regular diameters and in the range of tens of micrometers in any of the conditions tested.

The development of new skin substitute that aids in healing will be a viable solution that soon everyone will have access to.

Keywords: chitosan; gelatin; polyoxyethylene; polyprolactone; FTIR; SEM; cell cultures; electrospinning; freeze-drying.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Feridas e cicatrização da pele	1
1.2.	Tratamentos de feridas	2
1.3.	Biomateriais.....	2
1.4.	Tamanho de Poros	3
1.5.	Métodos para produção de Scaffolds	3
2.	Materiais e Métodos	7
2.1.	Materiais	7
2.2.	Preparação de liofilizados.....	7
2.3.	Caracterização das amostras.....	7
2.3.1.	FTIR	7
2.3.2.	SEM.....	7
2.4.	Reticulação	7
2.5.	Ensaio de compressão	8
2.6.	Perda de Massa	8
2.7.	Culturas Celulares	8
2.8.	Eletrofiação	9
3.	Análise e discussão de resultados.....	11
3.1.	Otimização do processo de Liofilização.....	11
3.1.1.	Análise Morfológica (SEM)	11
3.2.	Reticulação.....	16
3.2.1.	FTIR	16
3.2.2.	Ensaio Mecânicos	18
3.2.3.	Perda de Massa	21
3.2.4	Culturas celulares	22
3.2.4.1	Matrizes ternárias	23
3.2.5	Eletrofiação	24
4.	Conclusões e perspectivas futuras.....	29
5.	Referências	32
6.	Anexos.....	36

Índice de Figura

Figura 1.1. – Imagem esquemática das diferentes camadas existentes na pele (adaptado de [1])	1
Figura 1.2. – Processo de eletrofiação (adaptado de [25])	4
Figura 3.1. – Imagens SEM dos liofilizados de CS, PCL e GEL: com PEO arrefecidos diretamente a -80 °C (A); sem PEO arrefecidos diretamente a -80 °C (B); com PEO arrefecidos primeiramente a 4 °C (C); sem PEO arrefecidos primeiramente a 4 °C (D).	11
Figura 3.2. – CS, GEL e PCL reticulados durante 72h (DHT).....	12
Figura 3.3. – Imagens SEM dos liofilizados de CS e GEL: 0,5% (A); 1% (B); 1,5% (C); 2% (D).....	13
Figura 3.4. – Imagens SEM dos liofilizados de PCL infiltrados na solução CS – GEL: PCL (1%) infiltrado CS – GEL(1%) – (A); PCL (1%) infiltrado CS – GEL (2%) – (B); PCL (2%) infiltrado CS – GEL (1%) – (C); PCL (2%) infiltrado CS – GEL (2%) - (D).	13
Figura 3.5. – Liofilizado PCL: 0,2% (A); 0,5% (B); 1% (C); 2% (D)	14
Figura 3.6 – Matriz Ternária: 0,4% topo (A); 0,4% base (B); 0,6% topo (C); 0,6% base (D); 0,8% topo (E); 0,8% base (F)	15
Figura 3.7. – Espectros FTIR das matrizes de CS e CS+GEL com diferentes tempos de reticulação ..	16
Figura 3.8. – Formação da amida	18
Figura 3.9. – Esterificação.....	18
Figura 3.10. – Módulos de Young para os vários tempos de reticulação das amostras CS – GEL.....	19
Figura 3.11. – Perda de massa em função do tempo de reticulação das amostras de CS – GEL	22
Figura 3.12. – Gráfico representativo da evolução da população nas diferentes amostras.	23
Figura 3.13. – Gráfico representativo da evolução da população nas amostras ternárias.	24
Figura 3.14. – Imagem SEM das fibras de PEO 8MDa com 4,5 ml/h de caudal	26
Figura 3.15. – Diâmetro de fibras com diferentes caudais	27

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. – Principais bandas de absorção do quitosano (adaptado de [35])	17
Tabela 3.2. – Principais bandas de absorção da gelatina (adaptado de [35])	17
Tabela 3.3. – Razão entre as bandas 1530 cm^{-1} pela 1640 cm^{-1} em função do tempo de reticulação ...	18
Tabela 3.4. – Valores dos Módulos de Young e Desvio padrão dos liofilizados de CS e GEL com diversos tempos de reticulação.....	19
Tabela 3.5. – Cálculo da densidade de um filme de quitosano e gelatina	20
Tabela 3.6. – Cálculo da densidade dos liofilizados de quitosano e gelatina.....	21
Tabela 3.7. – Médias de perda de massa	21
Tabela 3.8. – Evolução da população das células nas amostras reticuladas por diferentes tempos.	22
Tabela 3.9. – Evolução da população das células nas amostras ternárias	24
Tabela 3.10. – Resultados da eletrofição de PEO 8MDa (1%) em clorofórmio.....	25
Tabela 3.11. – Resultados do diâmetro das fibras de PEO 8M (1%) em clorofórmio obtidas utilizando a tensão mínima necessária (30 réplicas).	26

Abreviaturas e Acrónimos

AA – Ácido acético

CS – Quitosano

Da – Dalton

DHT – Desidratação térmica

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GEL – Gelatina

GTA – Glutaraldeído

HFFF2 – Fibroblasto de prepúcio fetal humano

MEC – Matriz extracelular

MT – Matriz Ternária

PCL – Policaprolactona

PEO – Polioxietileno

SEM – Microscópio eletrónico de varrimento

1. Introdução

1.1. Feridas e cicatrização da pele

A pele é responsável por uma grande parte das relações que existem entre o meio interno e o externo, sendo, portanto, considerada a barreira entre o corpo e o ambiente externo. É composta por três camadas, designadamente: epiderme, derme e hipoderme, como representado na figura 1.1. No caso de lesões profundas que afetam a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, tais como queimaduras do 3º grau, o processo de cicatrização é ineficiente, o que leva à formação de uma cicatriz [1].

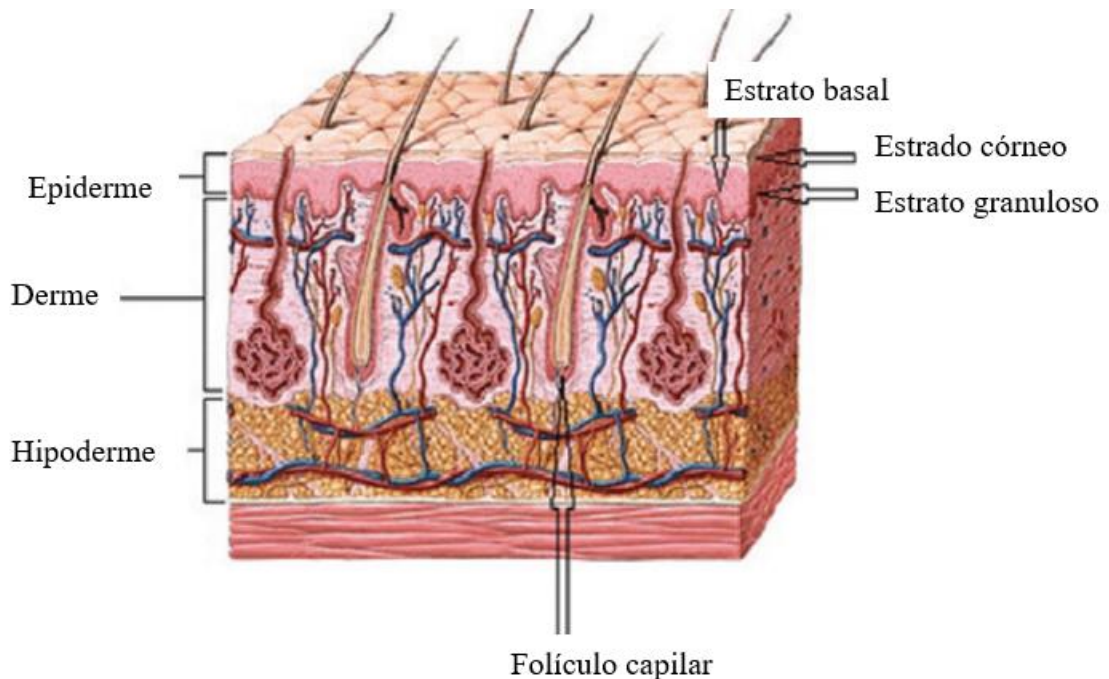


Figura 1.1. – Imagem esquemática das diferentes camadas existentes na pele (adaptado de [1])

O processo de cicatrização da pele inicia-se após uma lesão e é constituído por três fases: a resposta inflamatória, a formação de tecido e a remodelação do tecido.

Na fase inflamatória existem duas respostas primárias por parte do organismo às lesões. A resposta vascular, que consiste na coagulação sanguínea e hemostasia, e resposta celular compreendendo a infiltração de neutrófilos e monócitos. Imediatamente após a lesão, a hemostasia é alcançada através da formação de um coágulo, sendo as plaquetas as primeiras células a responder à lesão vascular. Os fatores de coagulação libertados pelas plaquetas promovem a agregação destas numa rede de fibrina. Posteriormente, as células presentes no coágulo libertam vasodilatadores que desencadeiam a resposta inflamatória.

A resposta celular, é mediada pelos neutrófilos e pelos monócitos. Os neutrófilos são responsáveis pela fagocitose de bactérias e da matriz extracelular danificada. Os monócitos diferenciam-se em macrófagos que são células reguladoras com a função de libertar espécies reativas de oxigénio, enzimas, fagocitose de organismos patogénicos e eliminação de detritos. Os macrófagos assumem uma importância determinante durante todo o processo de cicatrização. Nas fases subsequentes, os macrófagos produzem uma série de fatores de crescimento que regulam a ação dos fibroblastos, a migração e proliferação de células, a produção de proteínas da matriz extracelular (MEC) e a angiogénese [2].

Na segunda fase do processo, ocorre a formação de novo tecido. Aproximadamente 4 dias após a lesão começa a reconstituição dérmica, apenas possível graças aos fatores de crescimento e citosinas produzidos pelos macrófagos que atraem fibroblastos e células endoteliais. A angiogênese e a produção de componentes da matriz extracelular, tais como a fibronectina e o colagénio, pelos fibroblastos, conduz à formação da neoderme. [3] [4]

A terceira e última fase da cicatrização da pele é caracterizada pela remodelação do tecido recém sintetizado. Durante a segunda e a terceira semana pós-lesão ocorre a contração da ferida que envolve a interação organizada das células, matriz extracelular e citosinas. Esta contração é mediada pelos miofibroblastos que fazem a ligação entre as fibras de colagénio e a matriz extracelular através da ferida. Os fibroblastos e os macrófagos são responsáveis pela remodelação do colagénio. A matriz recentemente produzida é degradada por metaloproteinases, conduzindo a uma matriz constituída essencialmente por colagénio. Após a ferida estar completamente fechada, o processo de remodelação do tecido pode prolongar-se durante meses ou até anos [5] [6].

1.2. Tratamentos de feridas

Das três camadas que constituem a pele humana a epiderme é a única camada que tem maior capacidade de regeneração. A derme não tem capacidade de regeneração se for danificada mais do que 70%, ao contrário da epiderme, do fígado ou do osso [7]. Depois de sofrer danos extensos, nomeadamente por queimaduras, a cicatriz é difícil de ser evitada durante o processo de cura natural. Atualmente, o tratamento de feridas profundas que envolvam a derme, é feito através de enxertos de pele tais como auto-enxertos, alo-enxertos xeno-enxertos e substitutos de pele sintéticos [8]. No entanto os auto-enxertos apresentam limitações devido à falta de tecido para doar bem como à morbidez da zona dadora. Os xeno-enxertos e alo-enxertos possuem o risco de transmissão de doenças e de rejeição pelo sistema imunitário. Os substitutos dérmicos desempenham um papel fundamental na reconstrução da pele, reduzindo a formação de cicatrizes [7]. A criação de novos substitutos de pele que possam reconstruir a derme na sua integridade, proporciona um avanço nos métodos utilizados no tratamento de feridas [2]. Quando colocados no leito da ferida, o objetivo é que as células possam proliferar e sintetizar a nova matriz extracelular para conseguir a regeneração dérmica. Essa matriz é capaz de regular a migração, a proliferação, a diferenciação e a função metabólica das células, desempenhando e assim um papel importante na cicatrização de feridas [9].

Os *scaffolds* são os substratos dos substitutos dérmicos utilizados como suportes à regeneração da função biológica da pele e fornecem um ambiente adequado à proliferação celular para a formação de novas funções da MEC. [10] Os *scaffolds* para aplicações de pele são compostos por materiais poliméricos, que são processados através de diversas técnicas de forma a produzir estruturas tridimensionais porosas. [11]

1.3. Biomateriais

Têm sido estudados diversos materiais, tanto de origem sintética como natural, para a produção dos substitutos dérmicos. Os substitutos dérmicos têm sido desenvolvidos através de polímeros cujas propriedades se adequam positivamente às características procuradas à regeneração da pele: homeostático, propriedade antimicrobianas, acelerador de cura, etc [1][12]. *Scaffolds* à base de quitosano possuem, quando hidratados, boa elasticidade e flexibilidade e podem ajudar a reduzir a formação de cicatrizes causadas por queimaduras [11]. O quitosano é um polissacarídeo natural que existe em grande abundância na natureza e que se comporta como um polímero em solução [13]. Contudo, o quitosano (CS), nomeadamente após liofilização, também apresenta desvantagens tais como a elevada taxa de degradação, baixa resistência mecânica a baixas concentrações e fraca adesão celular. Possíveis abordagens para melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas do quitosano são o estabelecimento de misturas com outros polímeros, funcionalização e reticulação [14]. A gelatina, devido à sua origem (desnaturação do colagénio) proporciona ao *scaffold* um melhor mimetismo da matriz extracelular e melhora a adesão e proliferação celular [15].

O quitosano tem sido também utilizado em misturas com polímeros sintéticos, como a policaprolactona (PCL). A PCL é um poliéster sintético hidrofóbico caracterizado pela sua alta plasticidade, ductilidade e lenta taxa de degradação que pode ajudar a contrabalançar a rápida degradação de polímeros naturais e aumentar a estabilidade estrutural dos suportes obtidos de suas misturas [16]. No estudo realizado por Gomes et al. (2017) observou-se que as misturas PCL/CS-GEL (obtidas por eletrofiação) numa razão de 75/25 (m/m) respetivamente, de polímeros em solução apresentam melhores propriedades mecânicas, adesão e proliferação celular do que os *scaffolds* de PCL puro. Conclui-se também que os *scaffolds* estudados possuem características que permitam que sejam utilizados em engenharia de tecidos da pele, sendo as misturas de CS – PCL – GEL as que possuem melhores propriedades físicas, enquanto que as misturas PCL – GEL suportam uma maior taxa de adesão celular [15].

Observando casos particulares de substitutos de pele já existentes no mercado, o Integra® é um substituto sintético desenvolvido e fabricado como um bilaminado que contém duas camadas: a camada externa de silicone que desempenha o papel de uma epiderme, impedindo a evaporação da água e atuando como proteção contra microrganismos, e uma camada interna composta por sulfato de condroitina e colagénio bovino, reticulado com glutaraldeído e por DHT para produzir uma rede porosa esponjosa, obtida por liofilização, de aproximadamente 2 mm de espessura [17].

1.4. Tamanho de Poros

O tamanho de poros dos *scaffolds* está diretamente relacionado com o seu método de produção. No entanto, nem todos os *scaffolds* têm o tamanho de poros necessário à migração de células para o seu interior [18]. Um dos principais objetivos deste trabalho é investigar um processo para aumentar e controlar o tamanho dos poros num *scaffold* obtido por eletrofiação. Poros de tamanho reduzido impedem a migração celular, causando uma distribuição celular não uniforme ao longo da estrutura, limitando a vascularização e restringindo o crescimento de tecido [15][19]. No caso do processo de liofilização, esta investigação permitiu desenvolver o procedimento favorável à produção de amostras com tamanho de poro grande o suficiente a permitir a adesão e proliferação celular.

O tamanho dos poros está relacionado com o diâmetro das fibras que compõem o *scaffold*. Apesar do tamanho dos poros não poder ser padronizado para otimização de resultados de regeneração de tecidos, as dimensões ideais de poros para muitos tecidos são da ordem de 50- 200 μm [20]. Posto isto, inúmeras modificações nas técnicas de eletrofiação foram desenvolvidas para aumentar o tamanho de poros dos *scaffolds* através da redução da densidade de empacotamento das fibras. Diferentes técnicas, desde de variações simples nos parâmetros de eletrofiação a procedimentos complexos, foram exploradas. Ajustar os parâmetros do sistema como a tensão aplicada, distância do coletor à fieira, propriedades da solução polimérica e condições ambientais, foram desenvolvidas e modificadas até se atingir as fibras com as propriedades necessárias e viáveis [21]. Importa abordar de seguida que métodos temos para produção de *scaffolds*.

1.5. Métodos para produção de Scaffolds

Entre os métodos de produção de *scaffolds*, a eletrofiação destaca-se por produzir fibras com diâmetros tipicamente entre 100 nm e 1 μm que permitem obter uma estrutura fisicamente semelhante à da organização das proteínas fibrosas da matriz extracelular dos tecidos [21]. Esta técnica envolve a preparação de uma solução polimérica que é colocada numa seringa e dispensada através de um capilar, eletricamente carregado por uma fonte de alta tensão com polaridade positiva ou negativa [22]. À saída do capilar, a solução carregada é atraída para um coletor pelo campo elétrico existente entre o capilar e o coletor, ligado à terra. A evaporação do solvente e o estiramento do jato causado pela repulsão entre as cargas elétricas por este transportadas permitem produzir fibras de diâmetro reduzido [23][24]. O

processo de eletrofiação permite a obtenção de scaffolds ou matrizes poliméricas com as mesmas propriedades da MEC [16].

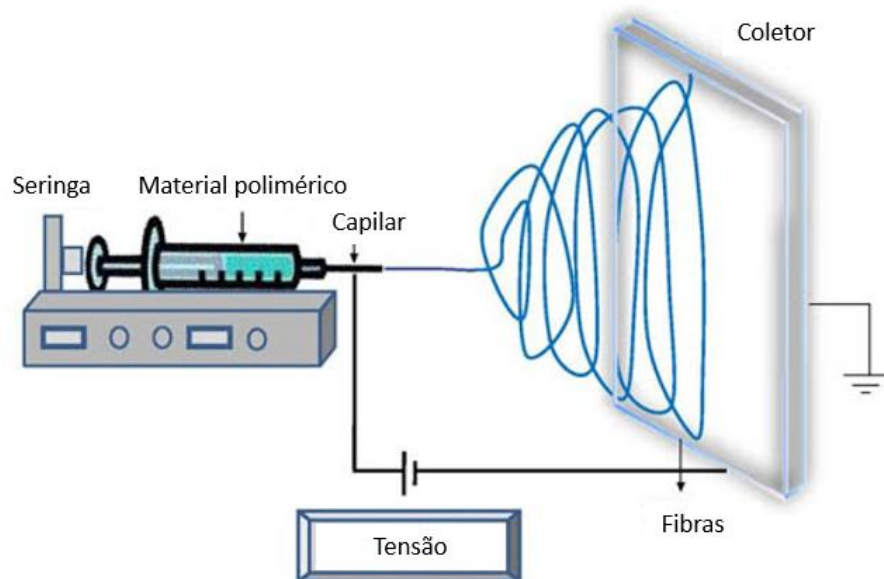


Figura 1.2. – Processo de eletrofiação (adaptado de [25])

O método de liofilização baseia-se na sublimação do solvente usado na preparação da solução. Este método permite obter uma estrutura extremamente porosa. A solução polimérica é submetida a temperaturas inferiores à de fusão do solvente, de maneira a solidificar o mesmo. Este processo causa uma separação de fases solvente/polímero. As amostras são liofilizadas em vácuo, promovendo a sublimação do solvente do estado sólido para o gasoso. Consequentemente, os poros que aparecem na matriz pertencem aos espaços anteriormente ocupados pelo solvente, ou seja, quanto maior for a percentagem de solvente em solução, maior será o tamanho de poro.

Foram desenvolvidas diversas amostras produzidas através dos processos de eletrofiação e liofilização [15]. Os *scaffolds* produzidos por eletrofiação permitiram avaliar o tamanho das fibras presentes assim como estudar a sua variação, relacionada com a mudança de parâmetros. Isto é, de forma a otimizar o tamanho da fibra, o processo foi moldado às combinações de parâmetros como a tensão, o caudal e a distância da agulha ao coletor de forma a obter o tamanho de fibra desejado.

Os *scaffolds* produzidos através de liofilização foram reticulados, numa primeira fase por vapores de GTA e posteriormente usando o método desidrotérmico (DHT), e testados em diversos aspetos. O método desidrotérmico resulta na extração de moléculas de solvente da estrutura, que promove a formação de ligações éster e amida por reações de condensação. A vantagem em relação à reticulação por elementos químicos, é a não interação com agentes tóxicos.

Foram utilizados diversos tipos de análises com o objetivo de otimizar o mais possível o tamanho de poros das amostras, o tempo de reticulação indicado de forma a não afetar as propriedades das amostras. Numa fase inicial visualizaram-se em SEM as diferentes amostras e verificar a porosidade obtida, o otimizou-se sua produção de forma a obter *scaffolds* porosos. De seguida, estudar o tempo de reticulação apropriado à obtenção de *scaffolds* com as características desejadas. Os ensaios mecânicos permitiram verificar a fragilidade do material através do cálculo do Módulo de Young, permitindo tirar conclusões à cerca do tempo de reticulação de acordo com a degradação das amostras [27]. No estudo celular, foram inseridas células HFFF2 (fibroblastos) nas mesmas o que permitiu verificar a adesão e proliferação das

células nas diferentes amostras ao longo do tempo e verificar em que tempo de reticulação se verificava uma maior viabilidade [15]. Utilizaram-se também os liofilizados para o estudo de perda de massa que consiste na inserção das amostras em H₂O e calcular a percentagem de material perdido após as mesmas estarem totalmente secas [28].

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Para obtenção de liofilizados foram usados: policaprolactona (PCL), polioxidoetileno (PEO), gelatina de peixe (GEL) e quitosano (CS). O PCL, PEO e GEL pertencentes à Sigma-Aldrich, e o CS a COGNIS S. Quanto aos solventes utilizados, a solução de PCL foi preparada com dioxano; as soluções de CS foram preparadas com misturas de água destilada (98% m:m) e ácido acético (AA, 2% m:m); as soluções de PCL – CS – GEL em H₂O:AA (10:90 m:m) e as de CS – GEL em H₂O:AA (98:2 m:m).

2.2. Preparação de liofilizados

Neste trabalho, foram produzidos liofilizados de diversas misturas poliméricas e em diferentes concentrações. Na produção de misturas utilizaram-se os polímeros em igual concentração (%m:m):

- PCL – CS – GEL: 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% e 2%
- PCL – CS – GEL- PEO: 1% e 2%
- PCL: 0,2%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,8%, 1%, 2%
- CS – GEL: 0,25%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,75%, 0,8%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%

As soluções eram deixadas a homogeneizar no agitador magnético (200-300 rpm) durante 48 horas. Após a homogeneização, foram transferidas para caixas de Petri revestidas com papel vegetal, para facilitar a sua extração depois de liofilizadas, e pré-congeladas a -80 °C. As amostras foram liofilizadas num liofilizador Vaco 2, Zirbus por um período de 48h ou 72h. Uma vez liofilizadas, as amostras que contêm gelatina foram reticuladas por desidratação térmica (DHT) na estufa durante: 8h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h.

Numa fase final, após análise dos resultados que foram obtidos, os liofilizados de CS – GEL foram impregnados na solução de PCL de forma a obter a matriz ternária (MT) isto porque o PCL não reticula a 120 °C [29].

2.3. Caracterização das amostras

2.3.1. FTIR

O FTIR permitiu avaliar a ligações químicas que ocorrem no processo de reticulação da gelatina por desidratação térmica. Os espectros foram adquiridos com o espectrómetro FT-IR Nicolet 6700, da Thermo Electron Corporation, no modo ATR (attenuated total reflectance) com uma resolução de 4 cm⁻¹.

2.3.2. SEM

A morfologia das amostras foi observada através de SEM (Carl Zeiss Auriga). Antes das amostras serem inseridas no SEM, as mesmas foram revestidas por uma mistura de ouro e platina (60:40) para melhorar a sua condutividade. Usando o software ImageJ, foi determinado o diâmetro das fibras. O resultado é expresso pela média ± desvio padrão da amostra.

2.4. Reticulação

A gelatina, devido à sua composição, apresenta vantagens perante outros materiais biológicos. No entanto, a sua taxa de degradação e a solubilidade em água são parâmetros bastante desfavoráveis à produção de *scaffolds*. A reticulação é o processo no qual um agente químico ou um processo físico serve como mediador na formação de ligações covalentes [30][31]. A reticulação por glutaraldeído (GTA), que consiste na inserção da amostra dentro de uma caixa fechada com a transmissão do elemento

químico para o material sob a forma de vapor a 37 °C, não se demonstrou eficaz devido à falta de infiltração do elemento químico na amostra. Os *scaffolds* de gelatina e quitosano foram reticulados a uma temperatura de 120 °C durante diferentes períodos.

2.5. Ensaios de compressão

As propriedades mecânicas das amostras obtidas após reticulação foram determinadas através de ensaios de compressão que permitem calcular o módulo de Young e a tensão de cedência das mesmas. Foram destacados, para cada tempo de reticulação, 30 cilindros de pelo menos 3 liofilizados, com 7 mm de diâmetro e espessura a variar entre os 3 e os 5 mm medida através de um micrómetro (µm). A máquina de compressão é composta por duas garras que vão comprimir os cilindros a uma velocidade de 3 mm/min nas condições ambientais, provocando a sua deformação. Estes ensaios permitem tirar conclusões acerca da resistência de material dada a sua deformação elástica. A máquina utilizada foi uma máquina de compressão de Hegewald & Peschke micro inspekt tensile test instrument equipada com uma célula de carga de 100 N [5].

2.6. Perda de Massa

Com o intuito de avaliar a eficácia da reticulação, realizaram-se testes de perda de massa. Numa situação ideal, a perda de massa será tanto menor quanto maior for o grau de eficácia da reticulação.

Para se estudar a perda de massa das amostras reticuladas usaram-se 5 réplicas de cada tempo de reticulação. As amostras e os frascos foram pesados individualmente, secos a 60°C durante 24h e pesados novamente para garantir que a amostra se encontra totalmente desidratada (m_i). Posteriormente, as amostras foram inseridas em água destilada e colocadas na estufa a 37 °C durante 24h. Uma vez retirada a água, as amostras foram novamente secas na estufa a 60 °C durante 24h. Finalmente, realizou-se a última pesagem das amostras (m_f) e calculou-se a perda de massa das mesmas através da seguinte equação:

$$p.d.m = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100\%$$

2.7. Culturas Celulares

Foram realizadas sementeiras de fibroblastos (linha celular HFFF2 - *human foetal foreskin fibroblast*) nos diversos scaffolds produzidos de modo a analisar a adesão e proliferação das células nas diferentes amostras. As amostras de CS – GEL reticuladas por diferentes tempos (0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h) são cortadas em cilindros de 12 mm, esterilizadas a 120 °C durante 2h e colocadas em suportes de teflon inseridos em placas de culturas com 24 poços. Foram utilizadas 6 réplicas de cada tempo sendo 2 delas de controlo de material e ainda dois poços para controlo de células. As células HFFF2 são mantidas dentro da incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ e são cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium, BioWest) com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Para determinação da viabilidade celular foi usada a resazurina, uma molécula com absorvância máxima a 600nm que é reduzida pelas células viáveis e que na forma reduzida, denominada resorufina tem um máximo de absorvância a 570 nm. A solução de resazurina (Alfa Aesar) preparada a 0,04 mg/ml em PBS foi utilizada para medição de viabilidade celular. O meio de cultura foi substituído por meio com 50% da solução de resazurina. Após 2h de incubação a absorvância do meio foi medida a 570 nm e 600 nm com o leitor de microplacas Biotex ELX 800UV. A absorvância corrigida é calculada subtraindo o valor da absorvância medida a 600 nm do valor medido a 570 nm e subtraindo o controlo de meio. O valor obtido é proporcional à população de células [24].

2.8. Eletrofiação

O processo de eletrofiação permitiu produzir fibras de PEO com o intuito de estudar o tamanho da fibra e controlar o processo de forma a garantir fibras de diâmetros na gama dos valores desejados (20 a 100 μm). O processo consistiu na colocação da solução de PEO dentro de uma seringa (5 ml) com uma agulha de calibre 21 onde estava ligado o polo positivo da fonte de tensão (Iseg HighVoltage), uma bomba de seringa (New Era Pump Systems) e um coletor rotativo e translativo ligado à terra. Os parâmetros utilizados foram variáveis: o caudal variou entre o 1 e 6 ml/h a distância da agulha ao coletor entre os 5 e 20 cm e a tensão entre 6,5 e 20 kV. Utilizou-se PEO com vários pesos moleculares: 100 kDa, 400 kDa, 900 kDa, 2 MDa e 8 MDa, em diferentes concentrações, dissolvido em clorofórmio (CHCl_3), de forma a encontrar a solução que permitisse variar o tamanho de fibras (adaptado de [15] [24]).

3. Análise e discussão de resultados

No trabalho anteriormente realizado por Gomes et al. 2017 foi produzida por eletrofiação uma matriz ternária, constituída por 3 polímeros (PCL, CS, GEL), que se mostrou eficaz no suporte, adesão e proliferação de fibroblastos humanos. [15] No entanto, as matrizes produzidas por eletrofiação apresentam um tamanho de poro demasiado pequeno impedindo a infiltração celular. De modo a ultrapassar este constrangimento neste trabalho foram desenvolvidos liofilizados com diversas concentrações dos polímeros constituintes da matriz ternária e parâmetros de congelação.

3.1. Otimização do processo de Liofilização

Numa fase inicial produziram-se soluções da matriz ternária com 2% de cada polímero, com e sem PEO a fim de perceber a importância do PEO na estrutura. Outro parâmetro analisado foi o arrefecimento das soluções. Com este propósito, amostras com e sem PEO foram arrefecidas a 4 °C e posteriormente congeladas a -80 °C, ou foram diretamente congeladas a -80 °C. No entanto, após o processo de liofilização, independentemente da presença ou ausência de PEO e do modo de congelação, as amostras apresentavam separação de fases entre os polímeros naturais (CS e GEL) e o polímero sintético (PCL).

3.1.1. Análise Morfológica (SEM)

A análise morfológica através de SEM permitiu concluir que não se verifica nenhuma vantagem em produzir liofilizados com PEO. No caso do gradiente térmico de arrefecimento a estrutura não aparenta sofrer quaisquer alterações. Em todos os casos verifica-se que os liofilizados apresentam uma estrutura pouco porosa, como se pode verificar na figura 3.1:

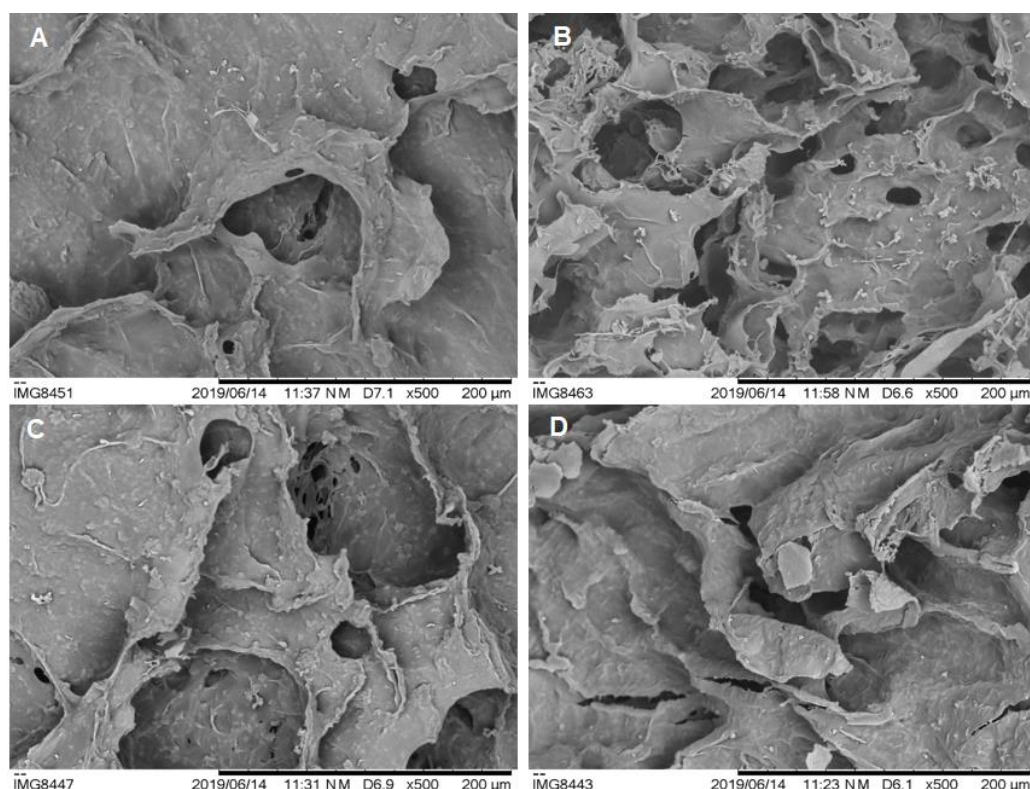


Figura 3.1. – Imagens SEM dos liofilizados de CS, PCL e GEL: com PEO arrefecidos diretamente a -80 °C (A); sem PEO arrefecidos diretamente a -80 °C (B); com PEO arrefecidos primeiramente a 4 °C (C); sem PEO arrefecidos primeiramente a 4 °C (D).

Na Figura 3.1 B (PCL GEL CS a -80°C) observa-se uma estrutura com poros mais abertos de acordo com o pretendido.

Um problema adicional à baixa porosidade dos liofilizados é a incapacidade de reticulação do CS e GEL com vapores de GTA. Os vapores de GTA apenas reticulam a superfície dos liofilizados, deixando o interior das amostras por reticular. Para além disso, o GTA possui propriedades nocivas às células humanas. Abdicou-se assim da reticulação por GTA na fase de vapor e optou-se pela reticulação através da temperatura, DHT. As amostras foram reticuladas durante 72h a 120°C e a sua estrutura analisada por SEM (figura 3.2).

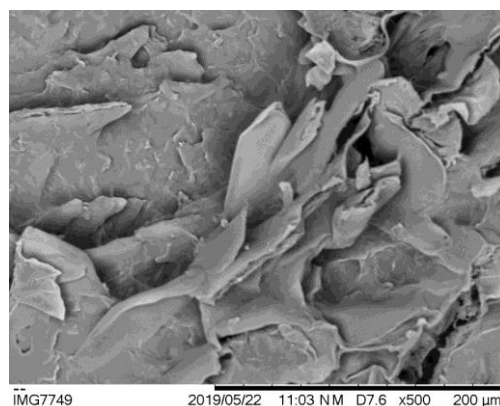


Figura 3.2. – CS, GEL e PCL reticulados durante 72h (DHT)

A reticulação por DHT demonstrou ser mais eficaz do que os vapores de GTA pois o calor atingiu toda a amostra de igual forma, obtendo-se uma amostra reticulada uniformemente. A reticulação proporciona à amostra uma cor mais escura proporcional ao tempo que tenha sido reticulada. [Anexo 1]

Numa segunda fase, procedeu-se a uma diminuição da concentração dos polímeros em solução, isto porque no momento da liofilização, a sublimação do solvente promove o aparecimento de poros sendo o volume destes proporcional à quantidade de solvente presente em solução. Quanto menor a percentagem de soluto na solução, maior será a porosidade da amostra final [33]. Para além da diminuição da concentração de material em solução, produziram-se soluções com apenas um ou dois polímeros como se pode verificar na figura 3.3. Esta divisão permite a reticulação por DHT do CS – GEL visto que o PCL funde a 120°C . Deste modo, liofilizados de misturas binárias de CS – GEL com concentrações de 0,5% apresentam uma elevada porosidade quando comparados com liofilizados de misturas com concentrações superiores.

De forma a obter uma matriz ternária combinando os três polímeros, foram produzidos liofilizados de PCL com concentrações de 1% e 2% e posteriormente foram imersos na solução de CS – GEL com a mesma concentração. Deste modo, introduziram-se os liofilizados de 1% na solução de 1% e 2%, e fez-se o mesmo com os de 2%. Em seguida, para sublimar o AA e a água utilizados como solventes na solução de CS – GEL, efetuou-se uma segunda liofilização. A figura 3.4 representa as imagens SEM das amostras obtidas.

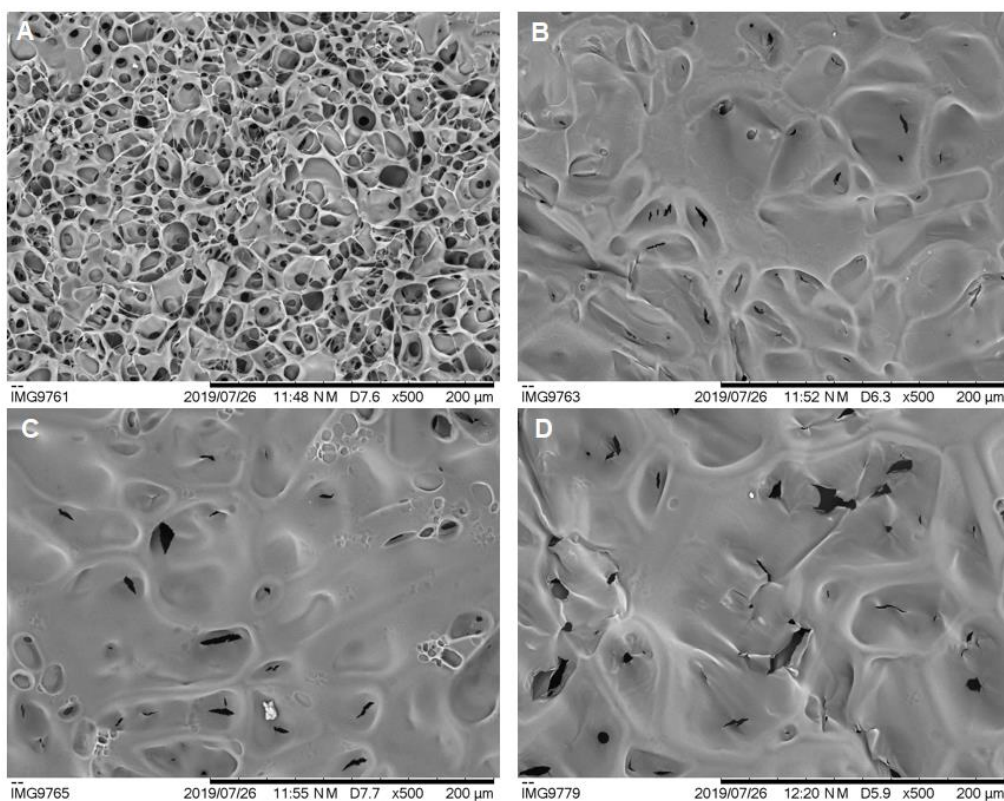


Figura 3.3. – Imagens SEM dos liofilizados de CS e GEL: 0,5% (A); 1% (B); 1,5% (C); 2% (D)

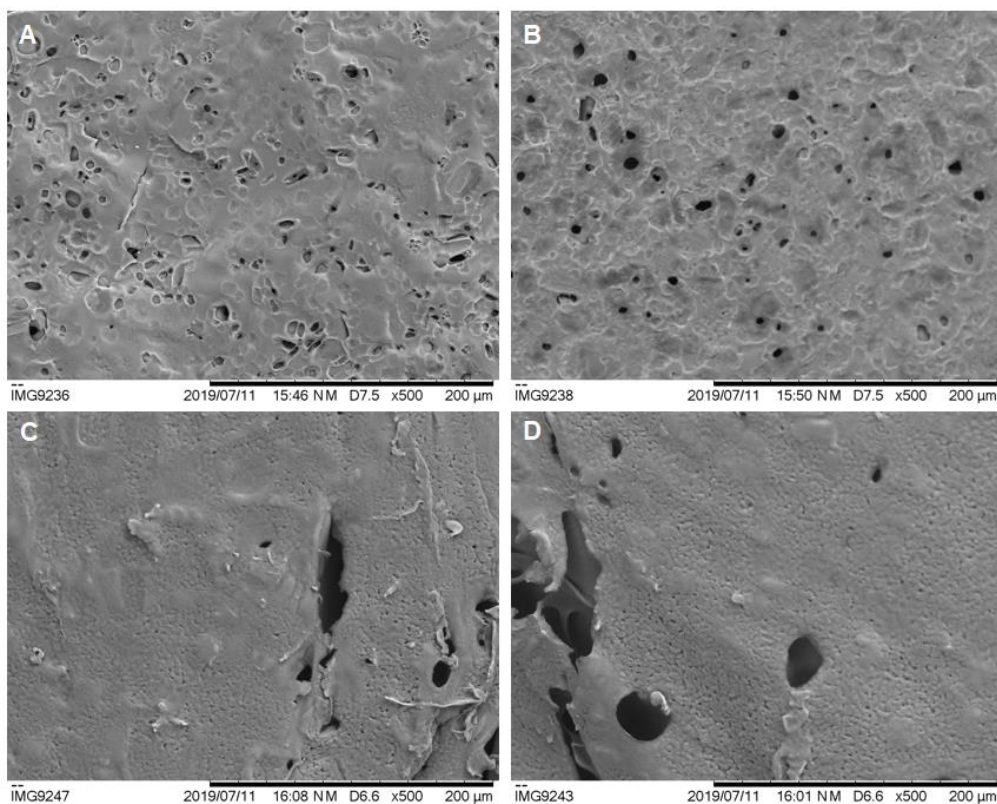


Figura 3.4. – Imagens SEM dos liofilizados de PCL infiltrados na solução CS – GEL: PCL (1%) infiltrado CS – GEL(1%) – (A); PCL (1%) infiltrado CS – GEL (2%) – (B); PCL (2%) infiltrado CS – GEL (1%) – (C); PCL (2%) infiltrado CS – GEL (2%) - (D).

Através das imagens SEM verificar-se a falta de poros em qualquer uma das amostras independentemente da concentração. Nota-se, no entanto, que as amostras com menor concentração têm ligeiramente mais poros. Na imagem A da figura 3.3 observam-se mais poros, mas estes encontram-se tapados. O caminho a seguir seria o de diminuir ainda mais a percentagem de polímero em solução.

No caso dos liofilizados de apenas PCL a abordagem foi no sentido de produzir uma amostra que fosse minimamente resistente e cuja porosidade fosse elevada. Produziram-se quatro amostras com diferentes concentrações e visualizou-se no SEM a sua estrutura morfológica (figura 3.5):

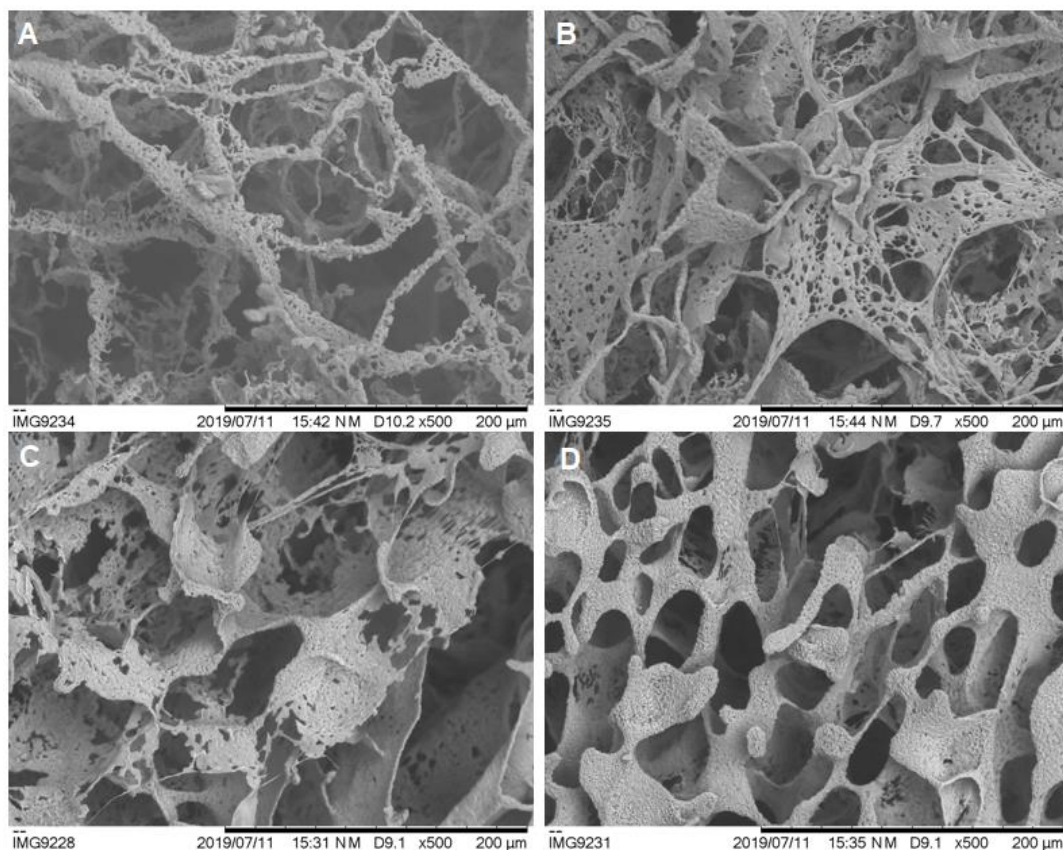


Figura 3.5. – Liofilizado PCL: 0,2% (A); 0,5% (B); 1% (C); 2% (D)

Pode-se verificar que quanto mais baixa a concentração do polímero maior a porosidade e a dimensão dos poros, apesar de ser evidente uma estrutura mais frágil.

Tendo em conta os estudos anteriores, optou-se por produzir amostras com baixa concentração de polímero de forma a obter uma matriz ternária final que contenha a porosidade necessária à migração de células [2][34]. Deste modo, foram produzidos liofilizados de CS e GEL com 0,4%, 0,6% e 0,8% reticulados durante 48h a 120 °C e posteriormente infiltrados com a solução de PCL de igual concentração. Depois de novamente liofilizadas, as amostras já com os três polímeros foram cortadas e visualizadas no SEM (figura 3.6).

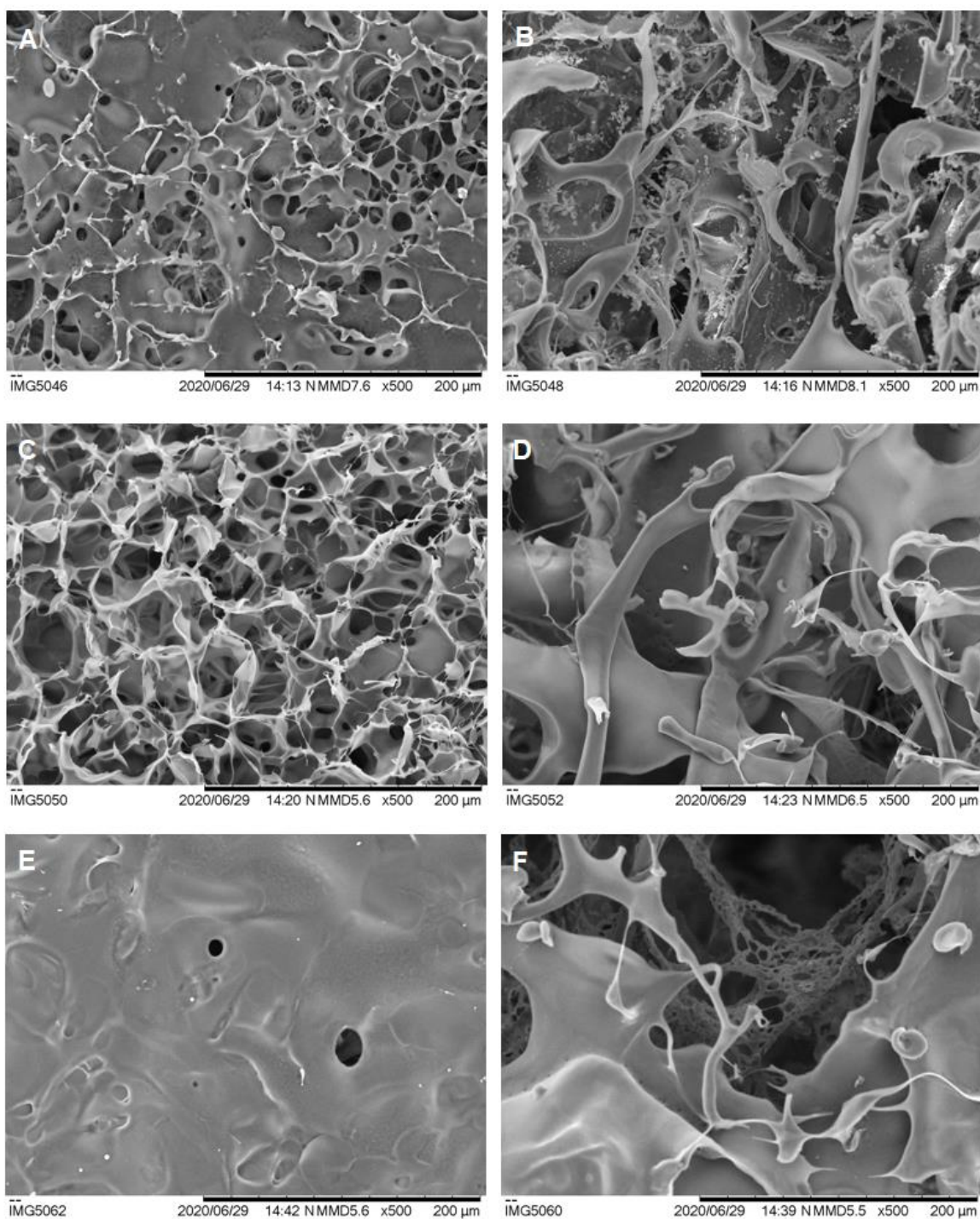


Figura 3.6. – Matriz Ternária: 0,4% topo (A); 0,4% base (B); 0,6% topo (C); 0,6% base (D); 0,8% topo (E); 0,8% base (F)

Observando as amostras ternárias podemos verificar que as amostras que contêm os poros mais abertos são as 0,4% e 0,6% de concentração de polímero. No entanto, quanto menor for a quantidade de polímero no liofilizados, maior será o tamanho de poro e menor será a sua resistência mecânica e, consequentemente, mais difícil será de manipular [15]. Assim, quando comparamos estas duas concentrações de polímero e assumindo que o seu tamanho de poro é idêntico, o liofilizado de 0,6% será o que melhor se adequa ao desejado, mantendo o compromisso entre elevada porosidade, poros abertos e resistência mecânica.

3.2. Reticulação

Tendo em conta os resultados obtidos por SEM no capítulo 3.1.1 a utilização de GTA foi rejeitada devido à sua ineficácia. Assim a reticulação foi feita através da temperatura (DHT) a 120 °C para reticulação das amostras com diferentes tempos para determinar qual o tempo de reticulação mais eficaz. O estudo do tempo de reticulação, foi feito com os liofilizados de quitosano e gelatina obtidos a partir da solução 1,5%. No final, após a reticulação dos liofilizados de CS e GEL, estes foram infiltrados com a solução de PCL e novamente liofilizados.

3.2.1. FTIR

A análise por FTIR foi usada para analisar o efeito da reticulação na estrutura química das membranas de quitosano e gelatina. Na figura 3.7 podemos observar os espectros de FTIR.

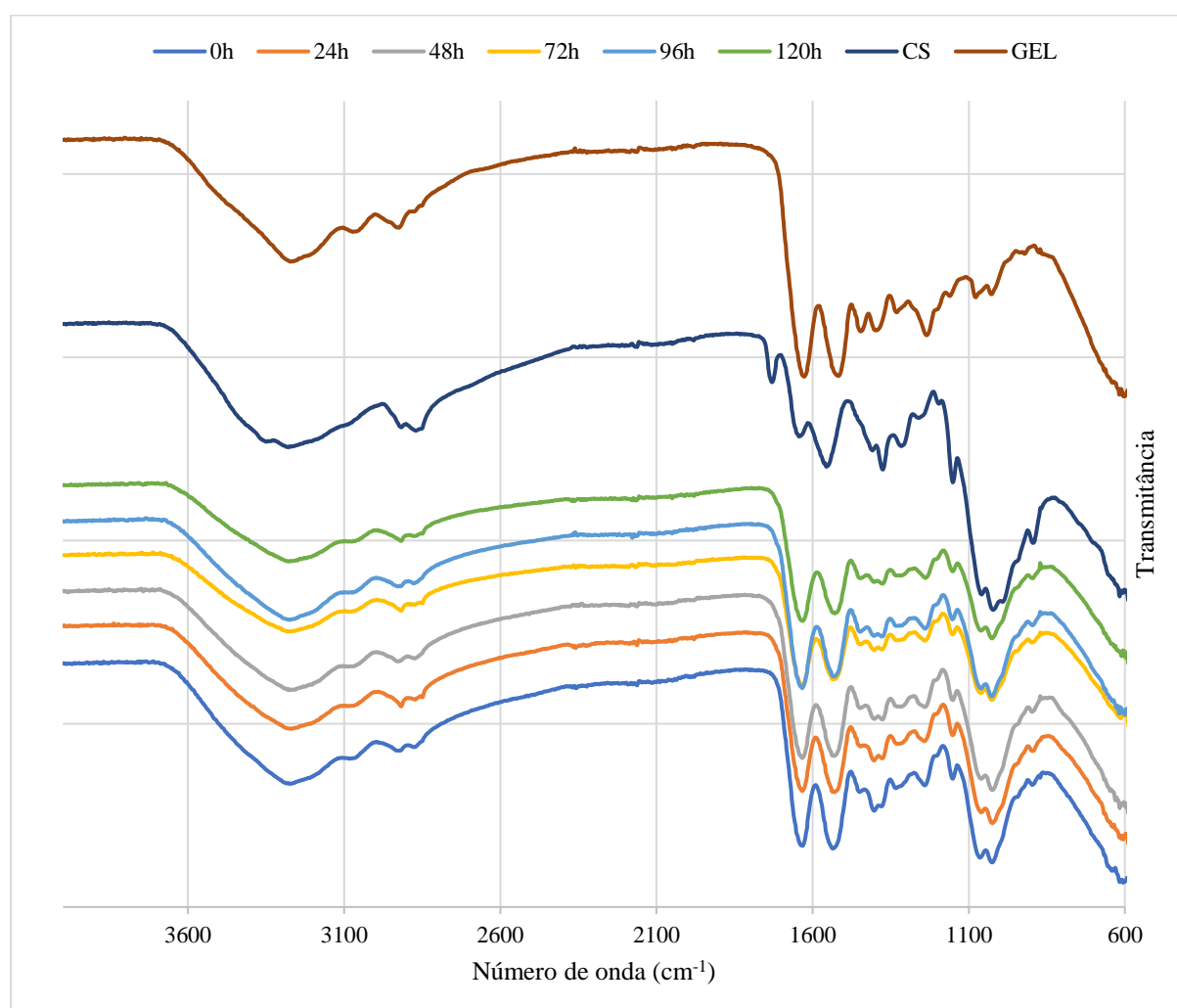


Figura 3.7. – Espectros FTIR das matrizes de CS e CS+GEL com diferentes tempos de reticulação

Segundo a análise das seguintes tabelas, podemos verificar as bandas de absorção de acordo com os picos referentes à figura 3.7:

Tabela 3.1. – Principais bandas de absorção do quitosano (adaptado de [35])

Polímero	Bandas de absorção (cm⁻¹)	Vibração Molecular / Ligação
CS	3400 - 3100	Estiramento das ligações N-H e O-H
	2922	Estiramento assimétrico CH ₂ do grupo CH ₂ OH
	2880	Estiramento C-H
	1655	Estiramento C=O (amida I)
	1590	Deformação angular NH da amina primária e banda amida II
	1380, 1255	Deformação C-CH ₃ e banda de amida III
	1150	Estiramento assimétrico C-O-C da ligação glicosídica
	1060, 1029	Estiramento C-O do anel polissacárido

Tabela 3.2. – Principais bandas de absorção da gelatina (adaptado de [35])

Polímero	Bandas de absorção (cm⁻¹)	Vibração Molecular / Ligação
GEL	3280	Estiramento N-H (amida A)
	1640	Estiramento C=O (amida I)
	1530	Deformação angular N-H e estiramento C-N (amida II)
	1240	Deformação angular N-H e estiramento C-N (amida III)

Pode-se observar na figura 3.6, que os grupos funcionais presentes no CS – GEL não reticulado também estão presentes nos restantes. Em ambos existe uma banda de absorção entre 3400 cm⁻¹ e 3100 cm⁻¹ características de grupos funcionais N-H e O-H, outra por volta de 1635 cm⁻¹ que corresponde ao estiramento das ligações C=O (banda de amida I), e ainda outra localizada a 1530 cm⁻¹ devido à deformação angular dos grupos N-H e ao estiramento da ligação C-N (banda de amida II) [24],[35],[36].

Analisando a tabela 3.3, verifica-se um aumento da razão entre as intensidades das bandas 1530 cm⁻¹ e 1640 cm⁻¹, isto porque quanto maior for o tempo de reticulação, mais reações de formação de amida ocorrem provocando uma diminuição de aminas. A transmitância será tanto maior quanto menor for a quantidade de aminas presentes na amostra, o que significa que quanto maior for o tempo de reticulação da amostra, maior será a razão entre as duas bandas [37].

Tabela 3.3. – Razão entre as bandas 1530 cm^{-1} pela 1640 cm^{-1} em função do tempo de reticulação

Número de onda (cm^{-1})	0h	24h	48h	72h	96h	120h
1530	45,97	51,34	51,20	62,18	52,87	60,16
1640	46,67	51,63	50,65	60,58	49,73	58,06
Razão de intensidades	0,99	0,99	1,01	1,03	1,06	1,04

Na figura 3.8 está representada a reação que leva ao desaparecimento das amins e a formação de amidas.

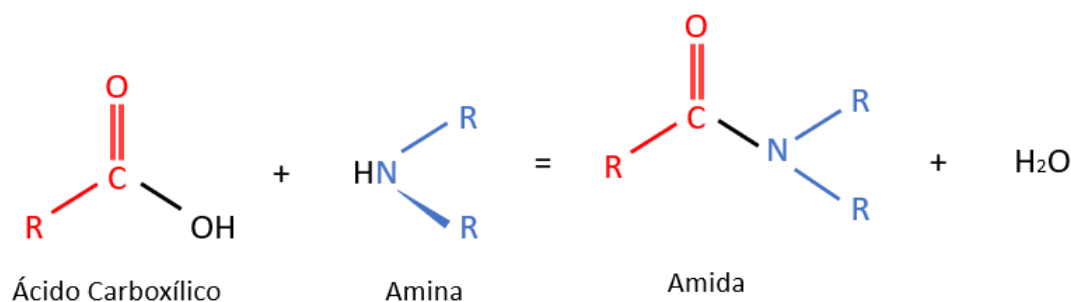


Figura 3.8. – Formação da amida

Durante a reticulação das amostras, poderão ocorrer outras reações como por exemplo a esterificação entre o OH do CS e os ácidos carboxilos da gelatina. No entanto, esta reação não é visível na figura 3.7, porque neste caso a ligação C=O não é afetada.

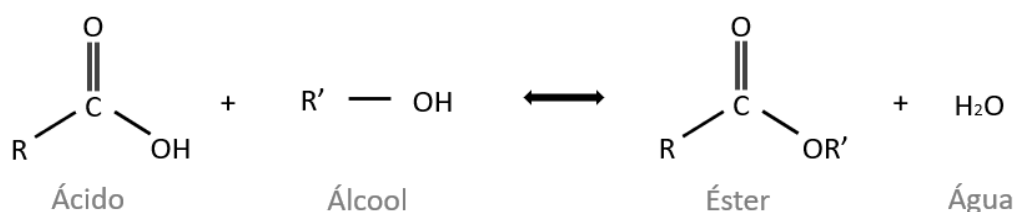


Figura 3.9. – Esterificação

3.2.2. Ensaio Mecânicos

De forma a analisar as propriedades mecânicas das amostras reticuladas com diferentes tempos, foram feitos trinta ensaios de compressão para cada tempo. Obteve-se, posteriormente, o gráfico da tensão em função da deformação. A deformação foi calculada através da divisão da compressão (Δl) pela espessura inicial da amostra (l_0), enquanto que a tensão foi determinada dividindo a força aplicada (F) pela área da amostra (A).

Nos gráficos tensão/deformação, sabe-se que na zona elástica todas as deformações às quais a amostra é sujeita são reversíveis, ou seja, caso se deixasse de aplicar a tensão de deformação no material este voltava ao seu estado inicial, sem ser afetado. Uma vez atingida a tensão de cedência, o material atinge o ponto a partir do qual sofre deformações permanentes. O declive da reta na zona de deformação elástica corresponde ao módulo de Young [38]:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

Onde σ é a tensão, E o módulo de Young e ε a deformação. Obtendo-se:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta l}{l_0}}$$

A liofilização é um processo com elevada variabilidade morfológica o que resulta em amostras com tamanhos de poro e sua distribuição bastante variada o que vai provocar a variação dos valores de módulo de Young de amostra para amostra como pode ser verificado pelo desvio padrão apresentado na tabela 3.4. Nesta tabela também é possível verificar a média dos módulos de Young das 30 réplicas de cada tempo de reticulação.

Tabela 3.4. – Valores dos Módulos de Young e Desvio padrão dos liofilizados de CS e GEL com diversos tempos de reticulação

	Módulo de Young (Pa)	Desvio Padrão (Pa)
0h	$5,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
24h	$8,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$
48h	$5,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
72h	$4,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
96h	$4,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
120h	$4,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$

Os valores de Módulo de Young apresentados na tabela 3.4 estão representados graficamente na figura 3.10.

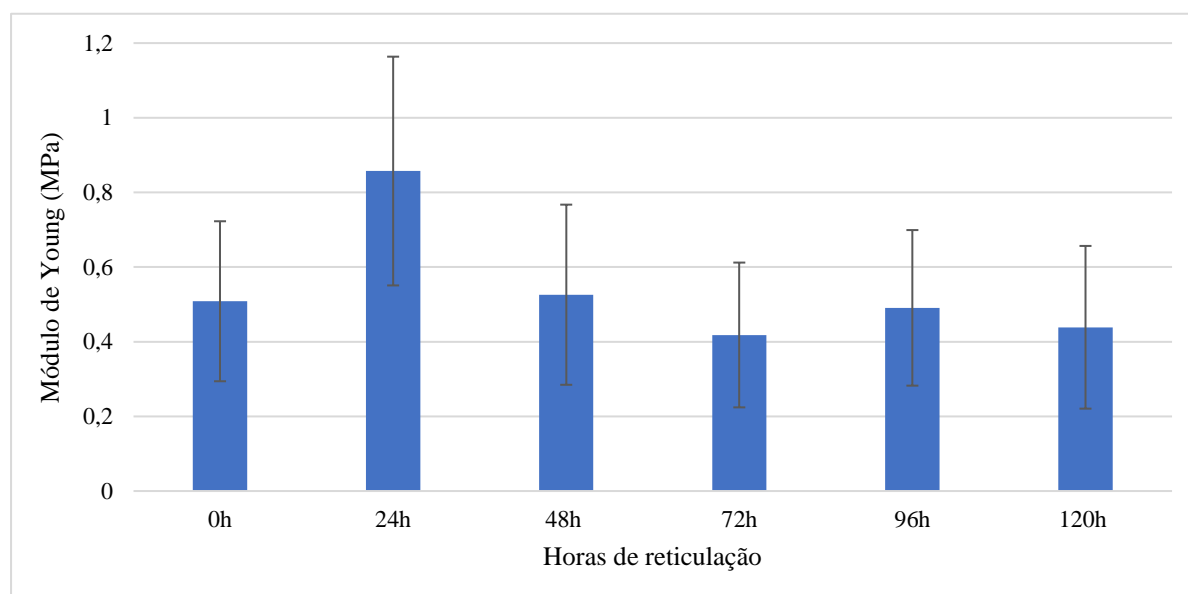


Figura 3.10. – Módulos de Young para os vários tempos de reticulação das amostras CS – GEL

O módulo de Young das amostras reticuladas durante 24h apresenta um valor superior ao dos restantes tempos de reticulação, sendo as diferenças estatisticamente significativas ($p=0,009$ para as 0h e $p=0,001$ para as de 48h). Isto poderá querer dizer que 24h de reticulação conduzem ao reforço da estrutura do liofilizado devido às novas ligações covalentes formadas durante a reticulação, mas após esse tempo os polímeros sofrem uma degradação que prejudica as suas propriedades mecânicas. As diferenças entre módulos de Young das amostras reticuladas por 48h ou mais e as não reticuladas não são estatisticamente significativas.

A porosidade dos liofilizados de quitosano e gelatina foi calculado pelo método de densidade através do cálculo do volume vazio da amostra (porosidade) pelo volume total da mesma:

$$P = \frac{V_{\text{vazio}}}{V_{\text{total}}} \Leftrightarrow P = \frac{V_{\text{total}} - V_{\text{material}}}{V_{\text{total}}} \Leftrightarrow P = 1 - \frac{V_{\text{material}}}{V_{\text{total}}}$$

Onde P é a porosidade, V_{total} é o volume total e V_{material} é volume do material e V_{vazio} é o volume vazio. Como a densidade é, por definição [39]:

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Obtemos para a porosidade em função da densidade das amostras porosas e do material não poroso [20]:

$$P = 1 - \frac{\rho_{\text{amostra}}}{\rho_{\text{material}}}$$

Produziu-se um filme de quitosano e gelatina para cálculo da densidade do material (ρ_{material}) de onde se retiraram 6 réplicas através de um punção circular de 10 mm de diâmetro. No caso do cálculo da densidade da amostra (ρ_{amostra}) as réplicas foram retiradas de amostras de liofilizados. Determinaram-se as massas e a espessura das amostras e obteve-se o volume, e daí a densidade dos filmes (tabela 3.5.) e dos liofilizados (tabela 3.6).

Tabela 3.5. – Cálculo da densidade de um filme de quitosano e gelatina

	Massa (mg)	Espessura (mm)	Área (mm ²)	Volume (mm ³)	Densidade (mg/mm ³)	Média (mg/mm ³)	Desvio Pa- drão (mg/mm ³)
FILME	4,1	0,034	113	3,85	1,066	1,14	0,07
	4,9	0,040	113	4,52	1,083		
	7,0	0,053	113	5,99	1,168		
	4,9	0,038	113	4,30	1,140		
	5,2	0,037	113	4,19	1,243		

Tabela 3.6. – Cálculo da densidade dos liofilizados de quitosano e gelatina

	Massa (mg)	Espessura (mm)	Área (mm ²)	Volume (mm ³)	Densidade (mg/mm ³)	Média (mg/mm ³)	Desvio Padrão (mg/mm ³)
LIOFI-LI-ZADO	17,3	2,865	113	115,96	0,149	0,15	0,02
	18,6	3,146	113	116,24	0,160		
	14,7	2,738	113	115,84	0,127		
	19,3	3,392	113	116,49	0,166		
	17,4	2,980	113	116,04	0,150		

Após o cálculo das médias de todas as réplicas, verificou-se que a porosidade é $(87 \pm 7) \%$ (adaptado de [40][41]).

$$P = 1 - \frac{0,15}{1,14} = 0,87 \pm 0,07$$

3.2.3. Perda de Massa

A perda de massa de um material determina a percentagem do mesmo que se perde quando entra em contacto com um solvente e permite aferir o grau de reticulação do material. No caso do estudo feito, foram utilizadas 5 amostra de cada um dos diferentes tempos de reticulação e o meio utilizado foi a água destilada (H₂O). Por natureza, o quitosano necessita de uma solução ácida (4 pH) para se dissolver enquanto que a gelatina é totalmente solúvel em água. Utilizou-se água para imergir os liofilizados com diferentes tempos de reticulação, que nos permite tirar conclusões acerca da solubilidade dos mesmos e de qual o tempo de reticulação mais eficaz. O objetivo da reticulação é que os polímeros em contacto com a água percam o mínimo de massa possível. A percentagem de massa perdida (p.d.m.) é dada pela seguinte equação:

$$\text{p.d.m.} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Os resultados obtidos para a perda de massa estão representados na tabela 3.7 e na figura 3.11.

Tabela 3.7. – Médias de perda de massa

	Percentagem de massa perdida (%)	Desvio padrão
0h	72,8	5,7
8h	36,5	1,0
24h	25,7	1,8
48h	23,2	0,6
72h	22,7	0,8
96h	24,2	1,7
120h	25,2	1,0

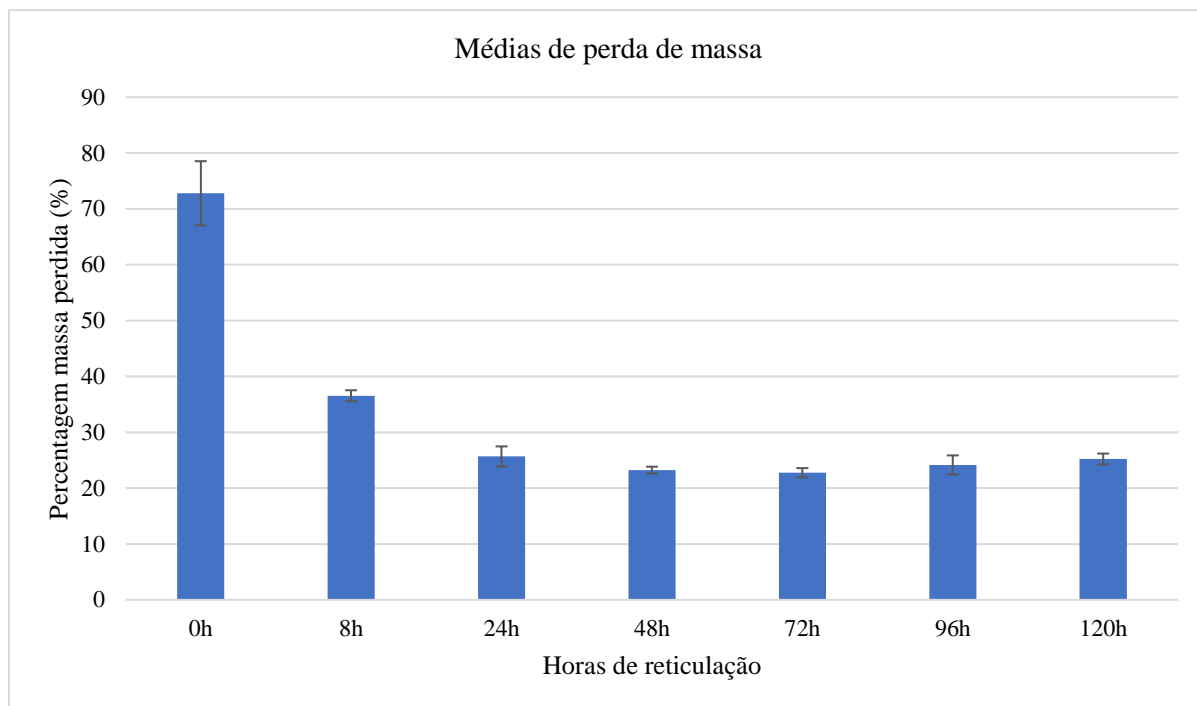


Figura 3.11. – Perda de massa em função do tempo de reticulação das amostras de CS – GEL

Analisando a tabela 3.7 e a figura 3.11 podemos verificar que as amostras não reticuladas perdem, em média, mais de metade do seu material em contacto com a água, enquanto que as amostras reticuladas 8h perdem cerca de um terço. A partir das 24h de reticulação as amostras demonstram perdas de massa com valores próximos dos 25%. Quer dizer assim, que 24h será o tempo suficiente para obter uma reticulação eficiente.

3.2.4 Culturas celulares

O processo de culturas celulares testa a viabilidade das células nas amostras com 1,5% de cada polímero em solução reticuladas com diferentes tempos. Foram usadas as células HFFF2 para o estudo de adesão e proliferação das mesmas nas amostras. Os valores da população celular foram normalizados ao controlo celular no dia 1.

Tabela 3.8. – Evolução da população das células nas amostras reticuladas por diferentes tempos.

Tempos	Dia 1	Erro	Dia 7	Erro	Dia 14	Erro	Dia 21	Erro
0h	0,19	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8h	0,19	0,04	0,36	0,05	0,36	0,05	0,37	0,04
24h	0,22	0,01	0,55	0,01	0,30	0,01	0,41	0,01
48h	0,22	0,03	0,54	0,03	0,66	0,04	0,87	0,02
72h	0,25	0,02	0,49	0,06	0,59	0,07	0,46	0,07
96h	0,19	0,02	0,17	0,03	0,05	0,02	0,05	0,03
120h	0,23	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CC	1,00	0,02	1,55	0,02	1,38	0,02	1,5	0,03

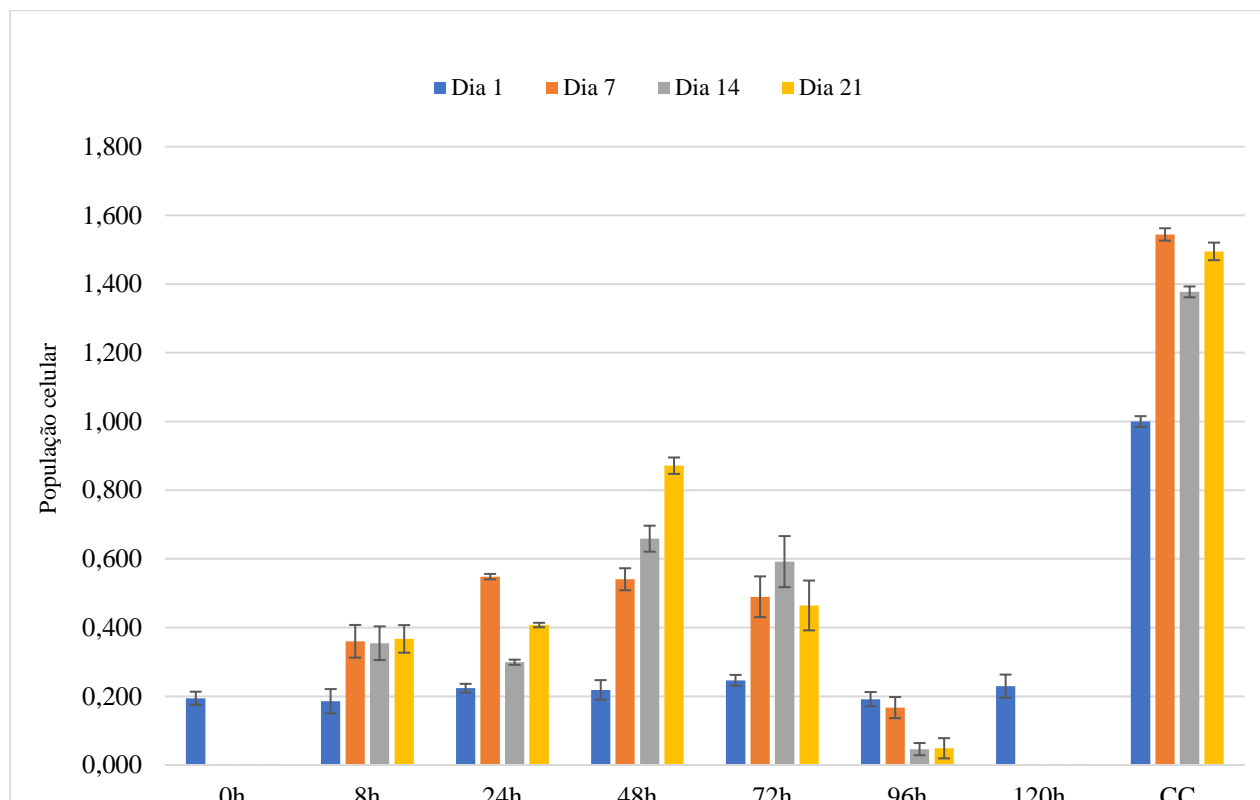


Figura 3.12. – Gráfico representativo da evolução da população nas diferentes amostras.

Analisando a figura 3.12 e a tabela 3.8 podemos verificar que a adesão (valores no dia 1) foi idêntica em todas as amostras, rondando os 20%, isto é, 24h após cultivadas houve adesão das células nas membranas de quitosano e gelatina de forma semelhante, quando comparadas ao controlo de células. A adesão celular de todas as amostras foi inferior ao controlo de células. No entanto, após 7 dias as células cultivadas nas amostras de 0h e 120h morreram. Logo, as amostras têm necessariamente de ser reticuladas para não se desintegrarem quando em contacto com o meio de cultura. Enquanto que nas amostras de 120h não ocorreu qualquer proliferação, isto porque as propriedades do quitosano e da gelatina foram demasiado afetadas pelo tempo de reticulação. No caso das amostras reticuladas durante 8h, 24h, 48h e 72h, as células proliferaram, o que indica que qualquer um destes tempos de reticulação é indicado para permitir a integridade da estrutura do *scaffold* sem alterar as propriedades do quitosano e gelatina, destacando-se entre estas as de 48h.

3.2.4.1 Matrizes ternárias

Após o estudo do melhor tempo de reticulação, produziram-se amostras ternárias. As concentrações destas amostras foram de 0,4%, 0,6% e 0,8% de cada um dos três polímeros. Devido às suas propriedades, hidrofóbico e sintético, o PCL não tende a promover a adesão celular o que significa que quanto maior a concentração de PCL, menor será a adesão celular, teoricamente [42]. A tabela 3.9 e o gráfico 3.13 permitem determinar a adesão e proliferação das células HFFF2 cultivadas nas amostras da matriz ternária (MT) com diferentes concentrações de polímero em solução.

Tabela 3.9. – Evolução da população das células nas amostras ternárias

MT Média	Dia 1	Erro	Dia 4	Erro	Dia 7	Erro
0.4%	0,423	0,018	0,447	0,037	0,758	0,054
0.6%	0,362	0,015	0,450	0,024	0,823	0,043
0.8%	0,371	0,022	0,464	0,036	0,753	0,043
CC	1,000	0,016	1,733	0,017	2,249	0,020

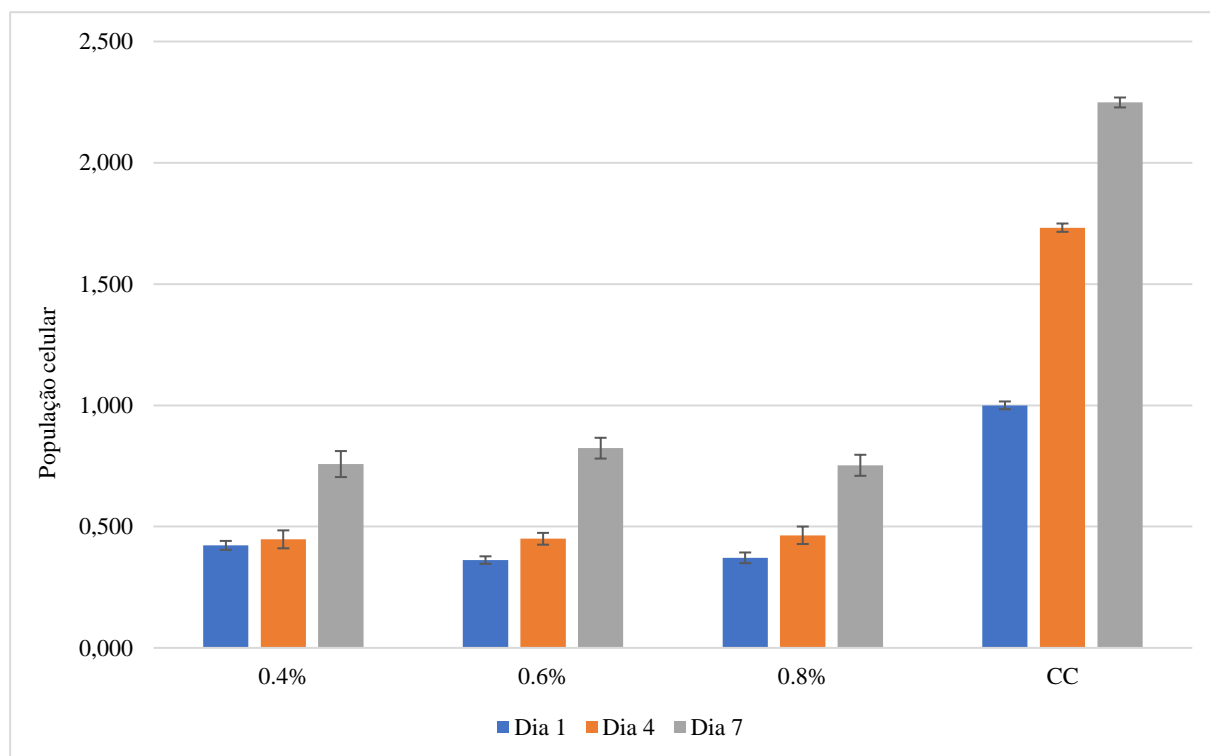


Figura 3.13. – Gráfico representativo da evolução da população nas amostras ternárias.

Analisando o gráfico acima, podemos verificar que, comparando com o controlo celular (CC), as células aderem e proliferam nas amostras ternárias. A taxa de adesão mais elevada verifica-se na amostra com 0,4% de concentração, com aproximadamente 42% de adesão. Posteriormente proliferam em todas as amostras de forma proporcional. A população celular aumentou 33% e 38% (normalizado ao dia 1 do CC) nas amostras de 0,4% e 0,8%, respetivamente. A amostra de 0,6% apresenta um aumento de população de 46%, sendo a subida mais elevada das três concentrações.

3.2.5 Eletrofiação

O processo de eletrofiação foi utilizado para produzir fibras de PEO de modo a controlar a largura e a morfologia das mesmas através da gestão dos parâmetros de eletrofiação. Quando inseridas num *scaffold* as fibras de PEO podem ser dissolvidas através da adição de água formando assim canais no lugar onde estas se encontravam. Esses canais promovem a migração e a infiltração celular e atribuem as características fundamentais à matriz ternária final [16].

No estudo inicial, usou-se o PEO com peso molecular de 8 milhões (1%) dissolvido em clorofórmio (99%). Começou-se por estudar a variação dos diferentes parâmetros de eletrofiação para analisar as fibras produzidas.

Tabela 3.10. – Resultados da eletrofiação de PEO 8MDa (1%) em clorofórmio

	Tensão (kV)				Caudal (ml/hora)				Distância (coletor)		Diâmetro Fibra (µm)
	7,5	15	20	25	0,3	1	3	5	15 cm	20 cm	
1	x				x				x		4,02
2	x				x				x		3,72
3	x				x				x		4,3
4	x					x			x		10,2
5	x					x			x		9,5
6		x					x		x		40,05
7		x					x		x		58,24
8		x				x			x		30,6
9			x			x				x	23,38
10				x			x			x	16,2
11				x				x		x	17,32
12				x				x	x		27,5
13		x						x	x		96,33

Analisando os dados e os parâmetros com base no tamanho das fibras (tabela 3.10) nota-se um aumento desejado no tamanho da fibra com o aumento do caudal. Por outro lado, com o aumento do caudal, maior quantidade de solução é transportada até ao coletor provocando o aumento do diâmetro das fibras. Por outro lado, com o aumento do caudal a deposição da fibra ficava colapsada no coletor, originando o efeito de fita, porque o solvente não evaporou totalmente no trajeto desde a ponta da agulha até ao coletor. No caso da tensão, não se verificou uma relação de proporcionalidade entre o seu valor e o diâmetro da fibra. A irregularidade da fibra na deposição era provocada pela alta tensão utilizada. Ou seja, quanto maior a tensão mais irregular se torna a deposição.

Verificando os valores da tabela 3.10 os valores do diâmetro da fibra dos ensaios 6, 7 e 8 são os que estão dentro dos valores pretendidos (entre os 50 – 100 µm) para permitirem a criação de canais que ajudem na infiltração das células nos *scaffolds*. Apesar disso, as deposições apresentam alguma irregularidade, o que leva a uma grande discrepância de tamanhos mantendo os parâmetros.

Realizaram-se testes adicionais com PEO de 100 kDa, 400 kDa e 900kDa com o propósito de aumentar a regularidade da deposição. Como o peso molecular é menor a percentagem de material dissolvido no clorofórmio será maior. Com o PEO de 100 kDa foram feitos testes para as concentrações de 12%, 15%, 18% e 20% (%m/m). A concentração de 18% foi a que permitiu obter fibras regulares. No entanto, só é possível produzir fibras ajustando o caudal para valores superiores a 3ml/h. Para valores inferiores o jato quebra e não se consegue manter o processo de eletrofiação contínuo. A utilização de caudais superiores a 3ml/h leva à obtenção de fibras com diâmetros superiores a 400 µm, o que é um valor bastante superior ao desejado para criar canais no *scaffold*. Canais com esta dimensão depois de dissolvidos podem levar ao colapso da estrutura do *scaffold* e as suas dimensões são muito superiores às dimensões da célula. Com o PEO de 400 kDa a 8%, o processo de eletrofiação não é estável após o ajuste dos parâmetros, a solução acaba por acumular-se na ponta da agulha com o aumento do fluxo ou o jato é interrompido com a sua diminuição mesmo variando os valores de tensão. As fibras obtidas a partir das

soluções de PEO de 900 kDa apresentam características semelhantes às fibras obtidas a partir das soluções de PEO 8 MDa, apesar de apresentarem maior irregularidade e com aspeto colapsado.

O aumento da distância da agulha ao coletor promove a evaporação do solvente. No entanto, quanto maior for a distância, maior terá de ser o valor da tensão promovendo uma maior desordem da fibra. Optou-se por realizar eletrofiação vertical, ou seja, a agulha era colocada verticalmente em relação ao coletor de forma a que a força gravítica auxiliasse a deposição da fibra no coletor sem ter de se aumentar a tensão. Procedeu-se ao estudo do diâmetro de fibra através da eletrofiação vertical com o PEO de 8 MDa fixando a tensão a 6,5 kV, o coletor a 12 centímetros e apenas alterando o caudal. O cálculo do tamanho das fibras foi feito a partir de imagens tiradas por SEM e posteriormente através do programa *ImageJ*. Na figura 3.14 está representado um exemplo da morfologia das fibras de PEO de 8 MDa.

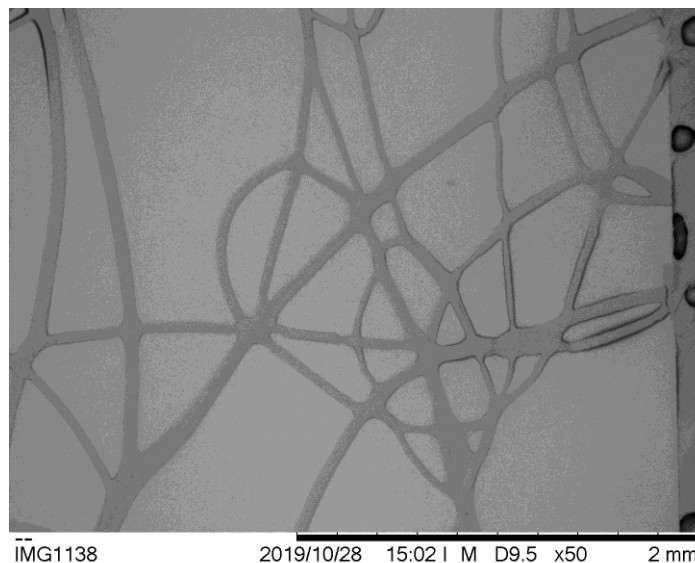


Figura 3.14. – Imagem SEM das fibras de PEO 8MDa com 4,5 ml/h de caudal

Tabela 3.11. – Resultados do diâmetro das fibras de PEO 8M (1%) em clorofórmio obtidas utilizando a tensão mínima necessária (30 réplicas).

Caudal	Média	Desvio Padrão
2,5 ml/h	40	18
3 ml/h	44	10
3,5 ml/h	64	25
4 ml/h	67	19
4,5 ml/h	57	20
5 ml/h	92	38

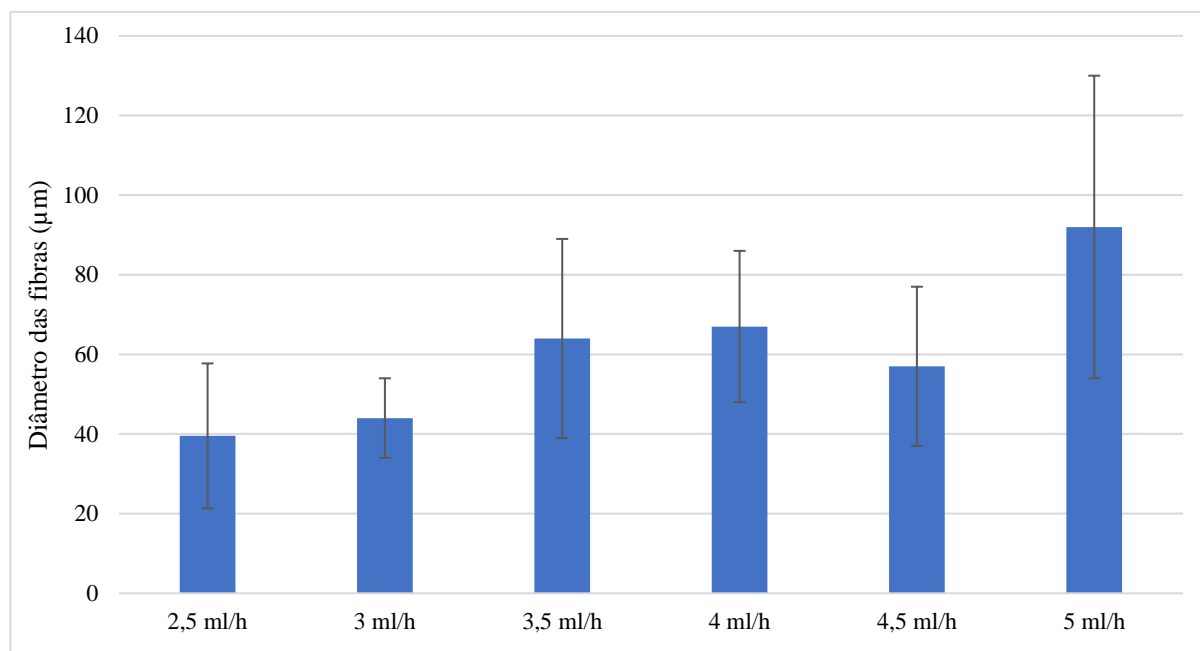


Figura 3.15. – Diâmetro de fibras com diferentes caudais

Analisando os resultados obtidos que estão representados na tabela 3.11 e na figura 3.15, verifica-se que quanto maior for o caudal maior é o tamanho de fibra, apesar do desvio padrão ser bastante elevado, o que é consequência do facto do tamanho das fibras na deposição ser bastante irregular. A partir de valores de caudal de 3,5 ml/h o valor médio do diâmetro das fibras é cerca de 60 μm , o que é um valor pretendido para a formação de canais no *scaffold* final [15]. No entanto, as fibras produzidas aparentavam não estar totalmente cilíndricas como é possível verificar na figura 3.14, estando algumas colapsadas indicando que não houve a evaporação total do solvente no trajeto entre a agulha e o coletor, tal como descrito anteriormente. Deste modo, apesar dos resultados obtidos serão necessárias a realização de mais testes e a otimização do processo de eletrofiação para a obtenção dos canais com o diâmetro e estrutura adequada.

4. Conclusões e perspectivas futuras

A presente dissertação teve como principal objetivo a produção, caracterização e estudo da migração de células na matriz dérmica do substituto de pele Skin2 através do uso de polímeros como o PCL, GEL e CS e células da derme.

Iniciou-se o trabalho pela preparação de liofilizados obtidos com soluções de diferentes concentrações de polímeros (misturas de PCL, CS e GEL) com e sem PEO. Verificou-se que a morfologia dos liofilizados não sofreu alterações com a presença do PEO e por isso este foi abandonado. As amostras produzidas foram reticuladas por DHT devido à falta de eficácia do GTA. De forma a permitir a reticulação por DHT das amostras de CS – GEL, houve a necessidade de separar o PCL dos outros polímeros. Para tal, produziram-se liofilizados de PCL e soluções de CS – GEL com a mesma concentração (0,5%, 1%, 1,5% e 2%) e infiltraram-se os liofilizados de PCL na solução de CS – GEL. Os resultados não foram satisfatórios pois os liofilizados tinham os poros à superfície fechados. Seguidamente, foram produzidos primeiro os liofilizados de CS – GEL e infiltraram-se depois na solução de PCL. Após a infiltração, conclui-se que as amostras com 0,6% de cada polímero são as que apresentam poros mais abertos à superfície.

Numa segunda fase deste estudo procedeu-se à produção de liofilizados de CS – GEL com 1,5% de concentração de cada polímero em solução, e estudou-se o tempo de reticulação ideal das amostras. Através do estudo do FTIR, verifica-se que a razão entre as bandas 1530 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} aumenta com o tempo de reticulação o que revela a formação de ligações amida. No caso dos ensaios mecânicos, observou-se que o módulo de Young das amostras reticuladas durante 24h é superior aos restantes e as diferenças são estaticamente significativas. Relativamente à perda de massa, destacam-se os valores de 48h e 72h que são os tempos de reticulação em que a massa perdida é menor. A porosidade das amostras é de 87%, o que nos indica que as amostras contêm porosidade suficiente para permitir a migração celular.

Nas culturas celulares, concluiu-se que as amostras com os tempos de reticulação de 0h, 96h e 120h não suportam a proliferação de células. Os tempos de reticulação superiores a 72h levam à alteração das propriedades dos polímeros, podendo mesmo culminar na sua degradação, impedindo a proliferação das células. O tempo de reticulação que permite uma maior viabilidade celular é o das amostras reticuladas durante as 48h pois é o tempo de reticulação que permite que as amostras apresentem maior taxa de crescimento celular após os 21 dias.

Nas culturas celulares com as amostras ternárias, verificou-se que as três concentrações em estudo (0,4%, 0,6% e 0,8%) não observam diferenças significativas quanto à adesão e proliferação celular durante uma semana. No entanto, a evolução da população celular nas amostras com 0,6% de concentração de polímeros em solução é a que apresenta um maior aumento. Assim, as amostras com 0,6% de polímeros em solução, tal como foi verificado através da análise morfológica, são as que apresentam melhores propriedades para a produção de um *scaffold*.

Quanto à eletrofiação, a principal preocupação foi desenvolver fibras com diâmetros na ordem dos 50-100 μm . Numa fase inicial efetuou-se eletrofiação horizontal, mas os resultados não foram os melhores. Em seguida optou-se por realizar eletrofiação vertical de modo a reduzir a tensão aplicada, utilizando assim a tensão mínima necessária de 6,5 kV. O PEO de 8MDa a 1% de concentração, foi o que garantiu melhores resultados, com diâmetros na ordem dos 60 μm para caudais entre os 3 ml/h e os 4,5 ml/h. No entanto, em alguns casos era evidente o colapso da fibra no momento da deposição devido à baixa concentração do PEO. Foram realizados ensaios com o PEO de 100 kDa a 15% e 20% de concentração, no entanto as fibras demonstraram elevada irregularidade e com tamanhos bastante variáveis, sem garantir o desejável.

Conclui-se assim, que os liofilizados com 0,6% de concentração deverão ser usados para a continuação deste estudo, assim como a reticulação por DHT durante 48h, a fim de desenvolver um *scaffold* final que permita a regeneração total da pele. Futuramente, deverão ser exploradas diferentes massas molares e concentrações de PEO. Adicionalmente, deverão procurar-se os parâmetros do processo de eletrofiação de forma a produzir fibras com dimensões adequadas à formação de canais que permitam a migração de células.

5. Referências

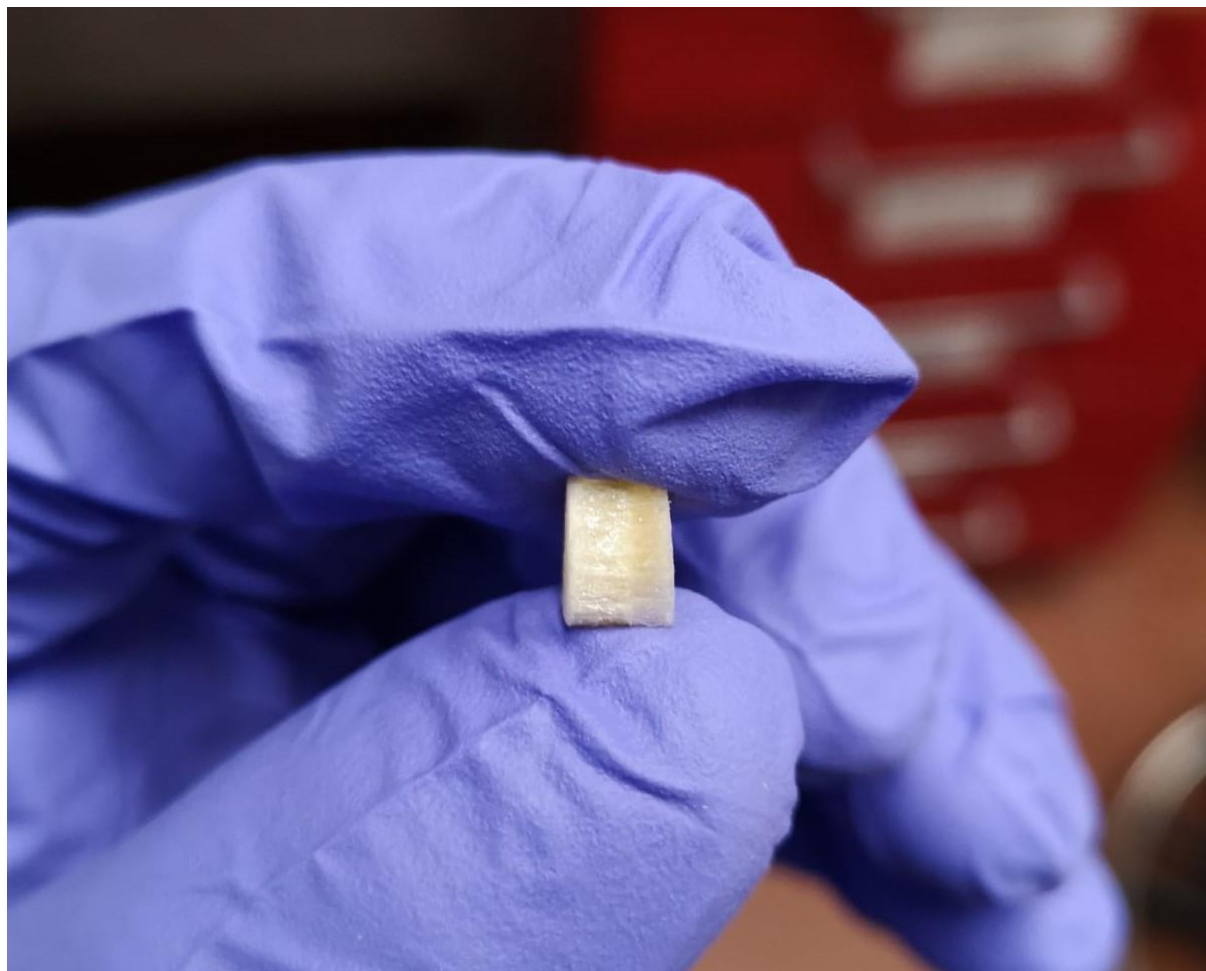
- [1] K. Vig *et al.*, “Advances in skin regeneration using tissue engineering,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 4, 2017, doi: 10.3390/ijms18040789.
- [2] H. Zhou *et al.*, “The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, no. 4, pp. 1208–1218, 2017, doi: 10.1002/jbm.a.35996.
- [3] S. Kumari, B. N. Singh, and P. Srivastava, “Effect of copper nanoparticles on physico-chemical properties of chitosan and gelatin-based scaffold developed for skin tissue engineering application,” *3 Biotech*, vol. 9, no. 3, p. 0, 2019, doi: 10.1007/s13205-019-1624-9.
- [4] D. M. Supp, A. P. Supp, S. M. Bell, and S. T. Boyce, “Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 114, no. 1, pp. 5–13, 2000, doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00824.x.
- [5] T. Scott, S. Number, and L. Nielsen, “Individual Inquiry Topic A Tissue Engineering Skin : Regeneration After Wounds,” no. October, 2000.
- [6] S. MacNeil, “Skin tissue engineering,” *Tissue Eng. Using Ceram. Polym.*, pp. 379–403, 2007, doi: 10.1533/9781845693817.2.379.
- [7] M. Rahimnejad, S. Derakhshanfar, and W. Zhong, “Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care,” *Burn. Trauma*, vol. 5, no. 1, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1186/s41038-017-0069-9.
- [8] T. Weng *et al.*, “Regeneration of skin appendages and nerves: Current status and further challenges,” *J. Transl. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1186/s12967-020-02248-5.
- [9] A. Shpichka *et al.*, “Skin tissue regeneration for burn injury,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1203-3.
- [10] J. Voorneveld, A. Oosthuysen, T. Franz, P. Zilla, and D. Bezuidenhout, “Dual electrospinning with sacrificial fibers for engineered porosity and enhancement of tissue ingrowth,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 105, no. 6, pp. 1559–1572, 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33695.
- [11] C. A., I. Olivas-Armendariz, J. S., and P. E., “Scaffolds for Tissue Engineering Via Thermally Induced Phase Separation,” *Adv. Regen. Med.*, 2011, doi: 10.5772/25476.
- [12] C. R. Weinstein-Oppheimer *et al.*, “The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing,” *J. Transl. Med.*, vol. 8, pp. 1–11, 2010, doi: 10.1186/1479-5876-8-59.
- [13] R. M. Baxter *et al.*, “Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 2, pp. 340–348, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34328.
- [14] E. Stodolak-Zych *et al.*, “Modification of chitosan fibers with short peptides as a model of synthetic extracellular matrix,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1211, p. 128061, 2020, doi: 10.1016/j.molstruc.2020.128061.
- [15] S. Gomes, G. Rodrigues, G. Martins, C. Henriques, and J. C. Silva, “Evaluation of nanofibrous

- scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 102, pp. 1174–1185, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.004.
- [16] A. C. Baptista, I. Ferreira, and J. P. Borges, “Electrospun Applications Fibers in Composite Materials for Medical,” pp. 56–65, 2013.
 - [17] H. S. Yang *et al.*, “Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 43, no. 11, pp. 622–629, 2011, doi: 10.3858/em.2011.43.11.070.
 - [18] T. D. Stocco, N. J. Bassous, S. Zhao, A. E. C. Granato, T. J. Webster, and A. O. Lobo, “Nanofibrous scaffolds for biomedical applications,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 26, pp. 12228–12255, 2018, doi: 10.1039/c8nr02002g.
 - [19] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
 - [20] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
 - [21] P. Fomby *et al.*, “Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report,” *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 12, no. 3, pp. 181–204, 2010, doi: 10.1002/term.
 - [22] T. J. Sill and H. A. von Recum, “Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.
 - [23] C. Vaquette and J. J. Cooper-White, “Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2544–2557, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.02.036.
 - [24] T. Vieira, J. C. Silva, J. P. Borges, and C. Henriques, “Synthesis, electrospinning and in vitro test of a new biodegradable gelatin-based poly(ester urethane urea) for soft tissue engineering,” *Eur. Polym. J.*, vol. 103, no. December 2017, pp. 271–281, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.04.005.
 - [25] S. Adiloğlu *et al.*, “Biofabrication of Tissue Scaffolds,” *Intech*, vol. i, no. tourism, p. 13, 2012, doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.12.014.
 - [26] R. J. Santos, “Síntese de Materiais Poliméricos para Regeneração de Tecido Muscular,” 2010.
 - [27] A. R. Sarasam *et al.*, “Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 7, no. 6, pp. 124–133, 2018, doi: 10.1016/j.msec.2013.05.039.
 - [28] Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, and S. V. Madhally, “In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 36, pp. 7616–7627, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.036.
 - [29] A. R. Sarasam, A. I. Samli, L. Hess, M. A. Ihnat, and S. V. Madhally, “Blending chitosan with polycaprolactone: Porous scaffolds and toxicity,” *Macromol. Biosci.*, vol. 7, no. 9–10, pp. 1160–1167, 2007, doi: 10.1002/mabi.200700001.

- [30] E. Khor, "Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses," *Biomaterials*, vol. 18, no. 2, pp. 95–105, 1997, doi: 10.1016/S0142-9612(96)00106-8.
- [31] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, and N. Roveri, "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking," *Biomaterials*, vol. 22, no. 8, pp. 763–768, 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00236-2.
- [32] M. Alizadeh, F. Abbasi, A. B. Khoshfetrat, and H. Ghaleh, "Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 7, pp. 3958–3967, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.05.039.
- [33] J. Wu and Y. Hong, "Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration," *Bioact. Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 56–64, 2016, doi: 10.1016/j.bioactmat.2016.07.001.
- [34] F. Han, Y. Dong, Z. Su, R. Yin, A. Song, and S. Li, "Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material," *Int. J. Pharm.*, vol. 476, no. 1, pp. 124–133, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.036.
- [35] N. Tabela, "Desenvolvimento de matrizes biomiméticas," pp. 3–6, 2000.
- [36] A. Teimouri, S. Roohafza, M. Azadi, and A. N. Chermahini, "Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nanodiopside composite scaffolds for tissue engineering application," *Polym. Bull.*, vol. 75, no. 4, pp. 1487–1504, 2018, doi: 10.1007/s00289-017-2096-x.
- [37] L. Cai, H. Shi, A. Cao, and J. Jia, "Characterization of gelatin/chitosan ploymer films integrated with docosahexaenoic acids fabricated by different methods," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-44807-x.
- [38] R. Goularte, "Joinville," 2014.
- [39] V. Guarino, F. Causa, and L. Ambrosio, "Porosity and mechanical properties relationship in PCL porous scaffolds," *J. Appl. Biomater. Biomech.*, vol. 5, no. 3, pp. 149–157, 2007, doi: 10.1177/228080000700500303.
- [40] V. Perez-Puyana, M. Felix, L. Cabrera, A. Romero, and A. Guerrero, "Development of gelatin/chitosan membranes with controlled microstructure by electrospinning," *Iran. Polym. J. (English Ed.)*, vol. 28, no. 11, pp. 921–931, 2019, doi: 10.1007/s13726-019-00755-x.
- [41] V. Perez-Puyana, M. Felix, A. Romero, and A. Guerrero, "Influence of the processing variables on the microstructure and properties of gelatin-based scaffolds by freeze-drying," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 25, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1002/app.47671.
- [42] J. Hodge and C. Quint, "The improvement of cell infiltration in an electrospun scaffold with multiple synthetic biodegradable polymers using sacrificial PEO microparticles," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 107, no. 9, pp. 1954–1964, 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36706.

6. Anexos

Anexo 1 – Exemplo duma amostra de CS – GEL reticulada por DHT



Anexo 2 – Procedimento preparação das amostras para as culturas celulares (adaptado de [24])



1. As amostras foram cortadas através de vazadores com 11 mm e esterilizadas através de radiação UV durante 30 min em cada lado.
2. As amostras foram colocadas em teflons de fabrico próprio foram inseridos posteriormente na placa de culturas com 24 poços.
3. Foi adicionado meio de cultura a cada poço para as amostras ficarem devidamente prontas para receber as células.
4. As células HFFF2 foram semeadas numa densidade de 20×10^3 células/cm² nas amostras com 0,5 cm² e nos poços da placa como controlo celular.
5. Os controlos celulares foram criados com a mesma densidade para ensaios de viabilidade
6. Após incubação durante 24h, foi avaliada a viabilidade celular através da resazurina.
7. A avaliação foi repetida por 1, 4, 7 dias no caso das matrizes ternárias e 1, 7, 14, 21 dias no caso dos liofilizados de CS – GEL reticulados com diferentes tempos, para avaliar a proliferação das células.